

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS**

**EXPRESIÓN DE FOXP3 EN CÉLULAS DE MELANOMA MURINO COMO  
UN MECANISMO DE EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE TUMORAL**

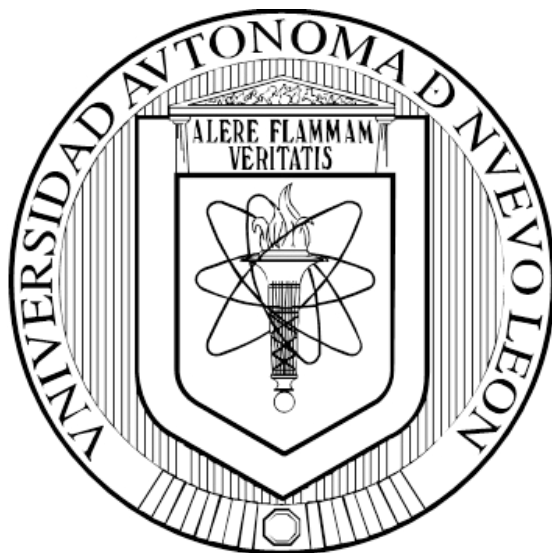
**POR**

**DIANA FABIOLA MIRANDA HERNÁNDEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA**

**MAYO 2014**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS**

**EXPRESIÓN DE FOXP3 EN CÉLULAS DE MELANOMA MURINO COMO  
UN MECANISMO DE EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE TUMORAL**

**POR**

**DIANA FABIOLA MIRANDA HERNÁNDEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA**

**MAYO 2014**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO**



**TESIS**

**EXPRESIÓN DE FOXP3 EN CÉLULAS DE MELANOMA MURINO COMO  
UN MECANISMO DE EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE TUMORAL**

**POR**

**DIANA FABIOLA MIRANDA HERNÁNDEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA**

**MAYO 2014**

## TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS .....	V
DEDICATORIA .....	VIII
LISTA DE TABLAS .....	IX
LISTA DE FIGURAS .....	XI
NOMENCLATURA.....	XIV
RESUMEN.....	XVIII
ABSTRACT .....	XIX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS .....	3
3. OBJETIVOS .....	4
3.1 Objetivo general .....	4
3.2 Objetivos específicos <i>in vitro</i> .....	4
3.3 Objetivos específicos <i>in vivo</i> .....	4
4. ANTECEDENTES .....	5
4.1 Cáncer .....	5
4.2 Melanoma .....	6
4.2.1 Factores de riesgo de melanoma .....	6
4.2.2 Historia natural de la enfermedad .....	8
4.2.3 Patoténesis del melanoma .....	9
4.3 Sistema inmunológico en cáncer .....	11
4.4 Mecanismos involucrados en el escape tumoral.....	13
4.5 Células T reguladoras .....	14

4.5.1	Tregs en tumores .....	17
4.5.2	Marcadores moleculares de Treg .....	18
4.6	FOXP3 .....	20
4.6.1	Estructura del gen FOXP3.....	21
4.6.2	Correlación entre la expresión de Foxp3 y desarrollo de cáncer .....	23
4.7	INTERLEUCINA 2 .....	27
4.8	CD25 Receptor de Interleucinas 2 .....	30
4.9	TGF-B.....	33
4.10	IL-10 .....	34
4.11	INF- $\gamma$ .....	36
<b>5.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>42</b>
5.1	Línea celular .....	42
5.2	Animales .....	42
5.3	Extracción de RNA.....	42
5.4	Obtención de cDNA.....	43
5.5	Expresión de Foxp3 .....	43
5.6	Detección de Foxp3 mediante microscopia confocal .....	44
5.7	Análisis de citometria de flujo para la determinación de CD25 y Foxp3 .....	45
5.8	Diseño y construcción de plásmidos que codifican para silenciar al gen FOXP3, sus características se encuentran en la siguiente tabla .....	45
5.9	Alineamiento.....	46
5.10	Ligación de los oligos alineados en el vector de expresión lineal siRNA .....	46
5.12	Verificación del plásmido recombinante .....	48
5.13	Extracción de plásmidos a mediana y grande escala .....	48
5.14	Preparación del polímero catiónico polietileamina (PEI) de 25 kDa para los ensayos de transfección.....	49
5.15	Preparación de los complejos para los ensayos de transfección <i>in vitro</i> .....	49
5.16	Ensayo de viabilidad con MTT .....	50
5.17	Selección de líneas celulares estables con silenciamiento de Foxp3 .....	51
5.18	Determinación de la sensibilidad de G418.....	51

sobre la producción de citocinas <i>in vitro</i> .....	69
<b>6.2 IN VIVO</b> .....	71
6.2.1 El silenciamiento de Foxp3 en las células B16F10.DMH1 afecta el desarrollo del melanoma murino.....	71
6.2.2 Expresión de Foxp3 en los tumores .....	74
6.2.3 Expresión de CD25 en tumores.....	77
6.2.4 Producción de citocinas.....	78
6.2.5 Evaluación de Linfocitos CD4 <sup>+</sup> infiltrantes de tumor .....	79
6.2.6 Evaluación de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> en células de bazo .....	82
6.2.7 Correlación entre los días de crecimiento tumoral, Foxp3, IL-2, CD25 <sup>+</sup> y peso tumoral en melanoma murino inducido con B16F10 wt y B16F10.DMH1 ...	85
<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	87
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	99
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	100
<b>RESUMEN BIOGRAFICO</b> .....	112

5.19 Generación de línea celular B16F10 con silenciamiento de Foxp3 (B16F10.DMH1).....	52
5.20 Análisis de proliferación celular de las líneas B16F10 y B16F10.DMH1 .....	52
5.21 Diseño experimental <i>in vivo</i> .....	53
5.22 Análisis de expresión del RNAm de Foxp3 en los tumores de melanoma murino inducido con células B16F10 <i>wt</i> y B16F10.DMH1 .....	53
5.23 Aislamiento de TIL, células B16F10 <i>wt</i> y B16F10.DMH1 intratumorales .....	54
5.24 Aislamiento de células T de bazo.....	55
5.25 Medición de producción de citocinas.....	55
5.26 Cuantificación de proteínas.....	56
5.27 Análisis de poblaciones celulares CD4 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> y Treg CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 en linfocitos T provenientes de TIL y bazo durante el desarrollo de melanoma murino inducido con células B16F10 <i>wt</i> y B16F10.DMH1 .....	56
5.28 Análisis de la expresión de CD25 <sup>+</sup> en TIL's y células de bazo durante el desarrollo de melanoma murino inducido con células B16F10 <i>wt</i> y B16F10.DMH1 .....	58
5.29 Evaluación de la sobrevivencia.....	58
5.30 Análisis Estadístico .....	58
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>59</b>
6.1 IN VITRO .....	59
6.1.1 Detección de Foxp3 y CD25 en células de melanoma murino B16F10 <i>wt</i> .....	59
6.1.2 Producción de citocinas en la línea celular B16F10 <i>wt</i> .....	61
6.1.3 Verificación de la construcción y expresión de los plásmidos recombinantes siFoxp3-1, siFoxp3-2 y siFoxp3-3 .....	62
6.1.4 Efecto del silenciamiento de Foxp3 sobre viabilidad de la línea celular de melanoma murino B16F10 <i>wt</i> .....	63
6.1.5 Establecimiento y generación de la línea celular B16F10.DMH1 con silenciamiento de Foxp3 .....	65
6.1.6 Análisis de CD25 <sup>+</sup> en células B16F10.DMH1 .....	67
6.1.7 Efecto del silenciamiento de Foxp3 en la línea celular B16F10.DMH1 sobre la proliferación celular in vitro.....	68
6.1.8 Efecto del silenciamiento de Foxp3 en la línea celular B16F10.DMH1 .....	

## **AGRADECIMIENTOS**

*Quiero expresar mi más sincero agradecimiento:*

### ***A Dios***

*Por ser siempre una constante en mi vida de salud, fé y fortaleza para llegar al día de hoy cumpliendo con un sueño más.*

### ***A mi familia***

*A mis padres y hermanos que siempre han sido mi apoyo incondicional, que en todo momento han estado a mi lado aún con la distancia, apoyando y sobre todo confiando siempre en mí. Los amo.*

### ***A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla***

*Jefa del Departamento de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, directora de tesis de este trabajo, le agradezco su disposición, apoyo y confianza a lo largo de este tiempo.*

### ***Al Dr. Moisés Franco Molina***

*Por ser mi asesor durante la realización de mi trabajo experimental y la revisión de mi tesis, por toda la confianza que depositó en mi desde el día en que llegué al laboratorio y que ha permanecido constante hasta el día de hoy, muchas gracias por todo su apoyo y sus palabras de aliento cuando más lo necesitaba.*

### ***A mi comité de tesis***

*Dr. Edgar Mendoza Gamboa, por brindarme su ayuda con gran disposición durante toda mi estancia en este laboratorio, por su apoyo, observaciones, sugerencias durante el desarrollo de mi proyecto y la revisión del mismo, al Dr. Pablo Zapata Benavides, por su colaboración y apoyo en aspectos técnicos para el mejoramiento de mi trabajo, así como por sus consejos y aliento a salir adelante.*



### ***A la Maestra Herlinda Vielma***

*Por su importante colaboración en el área de citometría de flujo, por su disposición, su confianza y ayuda.*

### ***A mis amigos del L6***

*A todos y cada uno de los que han formado parte del laboratorio durante todo este tiempo y que con su amistad, fraternidad, disposición y apoyo convierten día a día una estancia más amena. De cada uno de ustedes me llevo algo especial, más que compañeros o amigos ustedes se convierten como una familia. Luis, Crystel, Erika, Mariel, Carmen, Edgar, Oscar, Karen, Yareellys y Alex.*

### ***A Santiago e Itza***

*A ustedes que me brindaron su amistad y apoyo durante el desarrollo de mi trabajo, por sus consejos y compartirme sus conocimientos para el mejoramiento del mismo.*

### ***A los integrantes del LIV***

*A maestros, compañeros y personal del laboratorio, quienes integran de alguna u otra manera el laboratorio de Inmunología y Virología, que día a día saludaban con una sonrisa, y siempre con la disposición de ayudar, Edgarito, Ashanti, Edgar Manilla, Karina, Fer, Cynthia, Karla, Beto, José Juan, profe Leonardo, Pamela Vicky, Willy, Don David, Mati, maestra Esther, Bertha, Anita, Laura, Marisela, Perita, Carmen, Eva.*

### ***Al laboratorio de Inmunología y Virología***

*Al laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, porque gracias a sus instalaciones y su equipo fue posible la realización de este trabajo.*

*A mis amigos de toda la vida que siempre me han apoyado y confiado en mi, que a pesar de la distancia me hacen sentir que siempre cuento con ellos. A todas las*

*personas que he conocido que llegan para quedarse o simplemente pasan para dejarme un aprendizaje más.*

***Al CONACYT***

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.*

## DEDICATORIA

*A ti Dios que me diste la oportunidad de vivir, haber llegado hasta este punto y de regalarme una familia maravillosa.*

*Este trabajo de tesis lo dedico principalmente a mis padres Juan Carlos Miranda Sifuentes y Maria Guadalupe Hernández Rangel, porque siempre han sido el motor de mi vida, siempre me faltan las palabras para expresarles mi sentimiento de agradecimiento y amor hacia ustedes. Gracias por siempre creer en mi, porque me han sacado adelante dándome ejemplos dignos de superación y entrega, por enseñarme con ejemplo el valor del amor a la familia, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre a pesar de la distancia han estado ahí conmigo impulsándome en los momentos más difíciles, y celebrando conmigo los momentos de felicidad, porque el orgullo que sienten por mi, siempre ha sido un gran impulso para ir siempre hasta el final, va por ustedes, por lo que valen, porque los amo y admiro el esfuerzo y sacrificio que han hecho por mi durante todos estos años al igual que con mis hermanos, los amo con todo mi corazón.*

*A mis hermanos; Juan Carlos, por todo tu amor, por estar apoyándome a pesar de la distancia y regalarme unos sobrinos maravillosos. A mi hermana Wendy Yazmín, gracias por todo tu apoyo, por ser la mejor hermana, quererme mucho y por darme también unos sobrinos hermosos. A mi hermano el más pequeño Michel gracias por tu amor y por tu forma de ser que te hace único, gracias por que se que cuento con ustedes para todo, gracias a la confianza que siempre nos hemos tenido, por el apoyo y la amistad. Los amo mucho y gracias por hacerme sentir que a pesar de las dificultades que hemos pasado nuestra familia es la mejor del mundo.*

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Niveles de evidencia para cada factor de riesgo de melanoma .....	7
2. Características de las secuencias blanco para FOXP3 .....	45
3. Elementos del vector pGSH1-GFP .....	46
4. Producción de citocinas en células de melanoma murino B16F10 <i>wt</i> .....	61
5. Valores de expresión de Foxp3, CD25 y producción de citocinas en las líneas celulares B16F10 <i>wt</i> y B16F10.DMH1 <i>in vitro</i> .....	70
6. Análisis de expresión de Foxp3 durante el desarrollo de melanoma murino .....	76
7. Producción de citocinas en tumores inducidos con células B16F10 <i>wt</i> y B16F10.DMH1 durante el crecimiento del tumor .....	78
8. Porcentaje de poblaciones de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> y CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> infiltrantes de tumor durante el desarrollo de melanoma murino inducido con células B16F10 <i>wt</i> y B16F10.DMH1 .....	81
9. Porcentaje de poblaciones de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> y CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> en células de bazo durante el desarrollo de melanoma murino inducido con células B16F10 <i>wt</i> y B16F10.DMH1 .....	84

10. Análisis de correlación entre los días de crecimiento tumoral, peso del tumor, expresión de Foxp3, CD25 y producción de IL-2 durante el desarrollo del melanoma murino inducido con células B16F10 <i>wt</i> .....	85
11. Análisis de correlación entre el peso del tumor, la expresión de Foxp3, producción de IL-2 y expresión de CD25 durante el desarrollo del melanoma murino inducido con células B16F10.DMH1 .....	86

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Proceso de desarrollo y metástasis del melanoma .....	9
2. Inmunopatogénesis del melanoma.....	10
3. Supresión tumoral extrínseca por el sistema inmune .....	12
4. Mecanismos inhibitorios de las células T reguladoras .....	15
5. Estructura de Foxp3 .....	22
6. Papel regulatorio, inflamatorio y programador de células T de la interleucina 2 (IL-2) .....	31
7. Prototipo para el diseño de oligos sentidos y antisentidos para su expresión en el plásmido PGSH1-GFP .....	46
8. Mapa del plásmido PGSH1-GFP .....	47
9. Secuencia linealizada de pGSHI-GFP.....	47
10. Análisis de expresión del RNAm de Foxp3 .....	59
11. Análisis de expresión de la proteína de Foxp3 en células de melanoma murino B16F10 <i>wt</i> .....	60

12. Caracterización de los plásmidos recombinantes que codifican para los RNAi contra Foxp3 .....	62
13. Silenciamiento de Foxp3 con siRNA inhibe la proliferación de células B16F10 <i>wt</i> .....	63
14. Análisis de expresión de Foxp3 en células de melanoma murino B16F10 <i>wt</i> con transfección transiente de los RNAi .....	64
15. Transfección estable del siRNA siFoxp3-1 en células de melanoma murino B16F10 <i>wt</i> .....	65
16. Análisis de expresión del RNAm y proteína de Foxp3 en células B16F10.DMH1 .....	66
17. Análisis de CD25 en células B16F10.DMH1.....	67
18. Análisis de proliferación celular en las líneas B16F10 <i>wt</i> y B16F10.DMH1 .....	68
19. Producción de citocinas en las líneas celulares B16F10 <i>wt</i> y B16F10.DMH1.....	69
20. Línea de tiempo de inducción y desarrollo del melanoma murino inducido con células B16F10 <i>wt</i> y B16F10.DMH1.....	72
21. Efecto de la implantación de células B16F10 <i>wt</i> y B16F10.DMH1 durante la evolución tumoral .....	73
22. Análisis de expresión de Foxp3 durante el desarrollo de melanoma murino inducido con células B16F10 <i>wt</i> y B16F10.DMH1 .....	75
23. Análisis de expresión de Foxp3 durante el crecimiento tumoral en células B16F10 <i>wt</i> y B16F10.DMH1 intratumorales .....	76

24. Análisis de expresión de CD25 en células de melanoma murino B16F10 <i>wt</i> y B16F10.DMH1 intratumorales .....	77
25. Evaluación de células T CD4 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> y CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> en linfocitos infiltrantes de tumor durante el desarrollo de melanoma murino inducido con células B16F10 <i>wt</i> y B16F10.DMH1 .....	80
26. Evaluación de poblaciones de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> y CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> en células de bazo durante el desarrollo de melanoma murino inducido con células B16F10 <i>wt</i> y B16F10.DMH1....	83



## NOMENCLATURA

APH	Aminoglucósido fosfotransferasa
Bcl-xL	Linfoma de células B extra grande
CD	Cluster de diferenciación
CD1d	Cluster de diferenciación 1
cDNA	DNA complementario
CNN	Cadena de noticias por cable
CTL	Linfocito T citotóxico
CTLA-4	Antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico
DAPI	4 ',6-diamino-2-fenilindol
DCs	Células dendríticas
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	deoxinucleósido trifosfato
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidermal
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

ERKs	Protein kinasas
Fas-L	Ligando de Fas
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FKH	Forkhead
FLIP	Proteínas inhibitorias FLICE
FOXP3	Forkhead box P3
g	Gravedades
GITR	Proteínas relacionadas al receptor del factor de necrosis tumoral inducio por glucocorticoides
HER2	Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano
HLA	Sistema de antígeno leucocitario humano
IARC	Agencia internacional para investigaciones en cáncer
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina-12
IL-2	Interleucina 2
IL-2R	Receptor de interleucina 2
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
INF- $\gamma$	Interferón gamma
IPEX	Síndrome de Inmunodeficiencia, Poliendocrinopatía, enteropatía, ligado a X
Jak	Janus Kinasa
LATS2	Supresor de tumor grande 2
LB	Medio (Luria Bertani)

M	Molar
MAPK	Proteínas Quinasas Activadas por Mitógenos
Mg <sup>++</sup>	Magnesio
MHC	Complejo mayor de Histocompatibilidad
miRNA's	microRNA's
mL	mililitro
Mm	milimolar
mRNA	RNA mensajero
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NaCl	Cloruro de sodio
NFAT	Factor nuclear de células T activadas
NFκB	Factor nuclear kappa B
ng	nanogramos
NH <sub>4</sub> Cl	Cloruro de amonio
NOX4	NADPH Oxidasa 4
Nrp1	Neuropilina 1
NSCLC	Carcinoma de pulmón de células no pequeñas
nTregs	T reguladoras naturales
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PE	Ficoeritrina
PE-Cy5	Ficoeritrina cianina 5

PEI	Polietilenamina
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
PRR	Regiones regulatorias de promotor
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
qRT-PCR	Retrotranscriptasa de PCR cuantitativo
Rel	Retículo endoplásmico liso
RNAi	RNA de interferencia
ROR- $\alpha$	Receptor- $\alpha$ orfano relacionado al ácido retinoico
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Retrotranscriptasa de PCR
SKP2	Proteína quinasa 2 asociada a la fase S
STAT	Transmisoras de señal y activadoras de la transcripción
TCR	Receptor de células T
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
TIL	Linfocitos infiltrantes de tumor
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF
Tregs	T reguladoras
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ M	Micromolar
YAP	Proteína asociada a Yes



## RESUMEN

Foxp3 es un marcador clave para identificación y función células T reguladoras, además su expresión se ha observado en diferentes líneas celulares de cáncer. El objetivo de este estudio fue determinar si la expresión de Foxp3 en células de melanoma murino actúa como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune tumoral, modificando citocinas involucradas en la fase de inmunoeedición de cáncer y promoviendo la generación de células Treg. En este estudio se determinó por primera vez la expresión de Foxp3 en las células melanoma murino B16F10 *wt*, y diseñamos RNA de interferencia en contra de Foxp3, además de analizar la expresión de CD25 y producción de IL-2, INF- $\gamma$ , TGF- $\beta$  e IL-10 para determinar su papel *in vitro*. Para la evaluación del efecto de Foxp3 durante el desarrollo tumoral *in vivo*, se estableció una línea celular con silenciamiento de Foxp3 la cuál identificamos como B16F10.DMH1 y se montaron dos modelos de melanoma murino, uno inducido con células B16F10 *wt* y otro inducido con células B16F10.DMH1, y se analizó progresión tumoral, producción de citocinas, expresión de CD25, Foxp3 y poblaciones celulares CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> en TIL's y células de bazo. Nuestros resultados *in vitro* demuestran que las células B16F10 *wt* expresan Foxp3 a nivel de RNAm y proteína, y su localización celular es principalmente perinuclear, además se encontró que estas células expresan CD25, y una producción de citocinas del tipo INF- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-10 e IL-2. Se encontró que la expresión de Foxp3 afecta la proliferación en células B16F10, encontrando una correlación positiva entre la expresión de Foxp3, CD25 e IL-2. *In vivo*, el silenciamiento de Foxp3 en las células B16F10.DMH1 afectó el desarrollo del melanoma incrementando el tiempo de aparición de tumor, sobrevida y disminuyendo el peso de los tumores, encontrando una correlación positiva entre Foxp3, CD25, IL-2 e IL-10 y negativa con la producción de IFN- $\gamma$ , además se determinó que Foxp3 intratumoral está correlacionado con la expresión y presencia de células Treg con fenotipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> en el microambiente tumoral y con una disminución de células T CD4<sup>+</sup> a nivel periférico, sin afectar a linfocitos T activados (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>). Estos datos sugieren que Foxp3, participa en el desarrollo de la tumorigénesis en melanoma murino *in vitro* e *in vivo*, con la capacidad de modular a citocinas, moléculas involucradas en el desarrollo tumoral, así como poblaciones celulares con fenotipo regulador en el tumor, pero no en periferia.



## ABSTRACT

Foxp3 is a key marker for identification and function of regulatory T cells, but its expression has been demonstrated in many tumor cell lines. The aim of this study was to determine if the Foxp3 expression in murine melanoma cells acts as a mechanism of tumor escape to evade of immune system responses, modifying cytokines involved in cancer immunoediting and promoting the generation of regulatory T cells. We determine for the first time the Foxp3 expression in B16F10 murine melanoma cells and constructed RNA's interferences against the Foxp3 gene, furthermore analyzed the CD25 expression and cytokines production of IL-2, INF- $\gamma$ , TGF- $\beta$  and IL-10 to determine their role *in vitro*. To evaluate the Foxp3 expression effect during tumor growth *in vivo*, was established a cell line with silencing of Foxp3 expression identified as B16F10.DMH1 and were mounted two murine melanoma models; induced with B16F10 *wt* and B16F10.DMH1 cells and evaluated the tumor progression, cytokines production, CD25 expression and the percentage of T CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells. The results *in vitro* shown the Foxp3 expression at RNAm and protein level in B16F10 cells and the cellular localization was found perinuclear, furthermore we found the CD25 expression and cytokines production of INF- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-10 and IL-2 in B16F10 *wt* cells, we found that Foxp3 expression affect the cellular proliferation, CD25 expression and IL-2 production determining a positive correlation between Foxp3, CD25 and IL-2. *In vivo*, the Foxp3 silencing in B16F10.DMH1 cells affected the melanoma growth increasing the time of tumor appearance, survival and decreasing the tumors weight, founding a positive correlation between Foxp3, CD25, IL-2, IL-10 and negative with IFN- $\gamma$ , furthermore found that intratumoral Foxp3 is correlated with the expression and presence of regulatory T cells with a regulator phenotype CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> in the tumor microenvironment and with a decreasing of lymphocytes T CD4<sup>+</sup> in periphery without affecting activated T cells (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>). This data suggest the participation of Foxp3 in tumorigenesis in murine melanoma *in vitro* and *in vivo* modulating cytokines, molecules involved in the tumor growth and cellular populations with a regulator phenotype in the tumor, but not in periphery.



## **1. INTRODUCCIÓN**

El cáncer se caracteriza por el crecimiento sin control de células anormales en nuestro cuerpo. Es considerada la segunda causa de muerte a nivel mundial después de enfermedades cardiovasculares, sin embargo, la incidencia y mortalidad por estas enfermedades van en descenso, mientras que el desarrollo del cáncer va en incremento. El cáncer de piel es el tipo de cáncer más común en los Estados Unidos, considerándose la tercer malignidad más común, registrando de 2 a 3 millones de casos anualmente a nivel mundial. El cáncer de piel puede dividirse según su origen celular en melanomatoso y no melanomatoso, representando el melanoma, el tipo de cáncer de piel con una elevada mortalidad relativa en comparación con el cáncer de piel no melanomatoso. El Melanoma es considerado uno de los cánceres más agresivos y resistente a tratamientos de los cánceres humanos. La incidencia del melanoma es considerada tres veces mayor en la población blanca en los últimos 20 años, con un estimado de 8650 muertes atribuidas a esta neoplasia en el 2009 (5550 hombres y 3100 mujeres). Sin embargo, a pesar de la explosión del progreso en el entendimiento de la biología y genética molecular de esta enfermedad, existen pocos tratamientos aprobados por la FDA para el tratamiento del melanoma, los cuales incluyen agentes biológicos y quimioterapéuticos convencionales. A pesar de ello, los tratamientos aprobados por la FDA que llegan a tener éxito sobre la naturaleza de la enfermedad demuestran una efectividad muy limitada, además de impactar de manera negativa en la calidad de vida del paciente que padece esta neoplasia en diferentes etapas.

El conocimiento de las células que participan en el mantenimiento de homeostasis de la respuesta inmunológica en el cáncer, y sus mecanismos, delimitan la implementación de tratamientos efectivos en contra del cáncer, por lo que el conocimiento de que tipos celulares están participando en la respuesta inmune antitumor y su impacto sobre los tumores es de gran interés. Actualmente se conoce que durante los inicios en el



desarrollo tumoral, las células del sistema inmunológico tienen la capacidad de detectar, y eliminar células tumorales (proceso de inmunovigilancia), sin embargo, este mecanismo de regulación, u homeostasis, puede ser roto debido a mecanismos que son desencadenados por las células tumorales, e incluso por la participación de las mismas células del sistema inmune como lo son las presencia de células T de fenotipo regulador (principalmente  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ ), de las cuales en la última década ha resurgido su interés en el estudio de mecanismos de tolerancia inmunológica, debido a que se ha reportado su presencia en diferentes tipos de cánceres ejerciendo un efecto supresor antitumor por medio del sistema inmune, además se ha visto su participación en el desarrollo y progresión del tumor. Siendo el factor de transcripción Foxp3 el marcador clave para la identificación de este subgrupo celular tanto en murinos como humanos, presentando entre ellos alta homología sugiriendo así una funcionalidad conservada. Sin embargo su activación no ha sido del todo elucidada, debido a que su expresión no solamente se encuentra en células hematopoyéticas y en órganos primarios linfoides como se creía con anterioridad, si no que se han encontrado reportes en que la expresión de FOXP3 no es exclusiva de linfocitos T, ya que se ha encontrado su expresión en diferentes líneas celulares de cáncer humano en donde su expresión se encuentra relacionada con mecanismos de evasión tumoral.

Por esta razón, nos resultó de gran interés desarrollar un proyecto que aporte un conocimiento básico del papel que desempeña Foxp3 en las líneas celulares de cáncer, realizando estudios tanto *in vitro* como *in vivo* con la línea celular de melanoma murino B16F10.

Este trabajo tiene como objetivo, determinar si la expresión de Foxp3 en células de melanoma murino afecta el desarrollo del tumor *in vitro* como *in vivo* modificando el microambiente tumoral como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune antitumor. Para esto se llevó a cabo por primera vez el análisis de expresión de Foxp3 en células B16F10 *wt* y se estableció una línea celular derivada de B16F10 con silenciamiento de Foxp3 para posteriormente montar un modelo de melanoma murino inducido con ambas líneas celulares.





## **2. HIPÓTESIS**

La expresión de FOXP3 en células B16F10 de melanoma murino favorece la adquisición del fenotipo de células T reguladoras y la evasión de la respuesta inmune antitumor.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Determinar si la expresión de FOXP3 en la línea tumoral B16F10 afecta el desarrollo del tumor e incrementa la población de células T reguladoras ( $CD4^+CD25^+FOXP3$ ) como un mecanismo de evasión a la respuesta inmune antitumor.

#### **3.2 Objetivos específicos *in vitro***

1. Determinar la expresión de FOXP3 en la línea tumoral de melanoma murino B16F10.
2. Determinar el efecto del silenciamiento de FOXP3 (siRNA) en la línea tumoral B16F10 de melanoma murino y la producción de citocinas (TGF- $\beta$ , IL-2, INF- $\gamma$ , IL-10).

#### **3.3 Objetivos específicos *in vivo***

1. Determinar el efecto del silenciamiento de FOXP3 en la línea celular B16F10 en un modelo de melanoma murino.
2. Determinar el efecto del silenciamiento de FOXP3 sobre la producción de citocinas (TGF- $\beta$ , IL-2, INF- $\gamma$ , IL-10), en un modelo de melanoma murino.
3. Determinar el efecto del silenciamiento de FOXP3 sobre el fenotipo de células T reguladoras ( $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ ) en un modelo de melanoma murino.



## **4. ANTECEDENTES**

### **4.1 Cáncer**

El cáncer es una proliferación acelerada, desordenada e incontrolada de las células de un tejido que invaden, desplazan y destruyen localmente y a distancia, otros tejidos sanos del organismo. Su extensión en otras zonas se debe a un efecto de metástasis, es decir, la diseminación de células cancerosas a través de la sangre o del sistema linfático y la implantación en otro sitio distante al tumor primari (Greenwald and Dunn, 2009). Las células cancerosas surgen como consecuencia de daños en el DNA ocasiondos por múltiples factores, tales como fumar, alcoholismo, infecciones virales, herencia genética, condiciones ambientales (Grandics, 2006; Greenwald and Dunn, 2009) . El cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial, en 2008 causó 7,6 milloes de defunciones (aproximadamente un 13% del total) ocurridas en todo el mundo, siendo los principales tipos de cáncer el pulmonar, gástrico, hepático, colorrectal, mamario, cervicouterino tomando en cuenta que los tipos de cáncer más frecuentes difieren dependiendo del sexo. Aproximadamente un 70 % de las muertes por cáncer resgistradas en 2008 se produjeron en países de ingresos bajos y medios. En México el cáncer es la tercera causa de muerte y según estimaciones de la Unión Internacional contra el cáncer, cada año se suman más de 128, 000 casos de mexicanos. En México, el 60% de los casos son detectados en etapas avanzadas. En 2009 la tasa de mortalidad por cáncer en México fue de 65 por cada 100,000 habitantes, según las cifras más recientes del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), ocupando los primeros 5 lugares en incidencia en México el cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer cerivocuterino, de pulmón y cáncer de estómago (CNN México).

Se prevé que las muertes por cáncer sigan aumentando en todo el mundo y alcancen la cifra de 13.1 millones en 2030 GLOBOCAN 2008 (IARC) Section of Cancer Information (19/11/2013).



## **4.2 Melanoma**

Dentro de las proliferaciones melanocíticas cutáneas se encuentran lesiones comunes, como los nevus melanocíticos (lunares comunes adquiridos), que en gran proporción los seres humanos poseemos, y el melanoma. El melanoma es la formación patológica de un tejido maligno cuyos componentes sustituyen los tejidos normales con un comportamiento biológico particularmente agresivo, al punto de constituir una de las principales causas de muerte por enfermedad cutánea

(Greenwald and Dunn, 2009; Zheng *et al.*, 2007)

El cáncer de piel se caracteriza por ser una enfermedad silenciosa, son frecuentes los casos de personas que adquirieron la lesión melanocítica que sin notar la evolución de la enfermedad, al momento de detectarlo es prácticamente imposible combatirlo. De todos los tumores, el melanoma es el que tiene mayor índice de regresión espontánea total, y se aprecia regresión parcial en 13% de los casos (Kelly *et al.*, 1985).

### **4.2.1 Factores de riesgo de melanoma**

- a) Edad. El melanoma es raro antes de la pubertad, con una edad media del diagnóstico de 45 años y su incidencia aumenta progresivamente hasta los 85 años (Curado M P, 2007).
- b) Sexo: el melanoma es más frecuente en las mujeres, aunque la tendencia actual es igualarse la incidencia entre ambos sexos, siendo la sexta neoplasia en frecuencia en mujeres, y la más común entre mujeres de 25 y 29 años (Darayani D, 2003).
- c) Clase social: En algunos estudios se ha propuesto el lugar de residencia y la clase social como factor de riesgo. Las personas de clase social alta y las que viven en las ciudades son las que con más frecuencia se exponen a la radiación solar de forma intermitente y se protegen menos durante el desarrollo de actividades lúdicas y deportivas (Geller AC, 1996).
- d) Raza: El riesgo de desarrollar melanoma en los individuos de raza blanca es 10 veces mayor que en los de raza negra, asiática o hispana, debido a las diferencias fenotípicas (Goldstein BG, 2001).



- e) Fototipo: Los pacientes con fototipo I y II de Fitzpatrick tienen un riesgo tres veces mayor de padecer melanoma (Schaffer JV, 2004).
- f) Nevus melanocíticos congénito. No está suficientemente evaluado (Paradela S, 2009).
- g) Nevus melanocíticos adquiridos. El riesgo se ha establecido con el número, localización, tipo y tamaño de los nevus (Markovic SN, 2007).
- h) Nevus displásicos. Definido como la presencia de melanoma en uno o más miembros de la familia (Tucker MA, 1993).
- i) Exposición solar: Principal causa de melanoma cutáneo (Kovalyshyn I, 2009).
- j) Exposición a fuentes artificiales de radiación ultravioleta (Diffey BL, 1991).
- k) Inmunosupresión: Existe mayor riesgo de melanoma en pacientes inmunodeprimidos, sin embargo el mecanismo exacto se desconoce (Greene MH, 1981).
- l) Xeroderma pigmentoso: En el Xeroderma pigmentoso existe una mayor disposición a padecer cáncer cutáneo no melanoma y melanoma.

La presencia de uno o dos de los factores de riesgo antes citados se asocia con un aumento del riesgo de desarrollar un melanoma de 2 a 4 veces mayor que en la población general y, cuando concurren tres factores de riesgo o más, el riesgo se multiplica por 20 (Cho *et al.*, 2005) (Tabla 1).

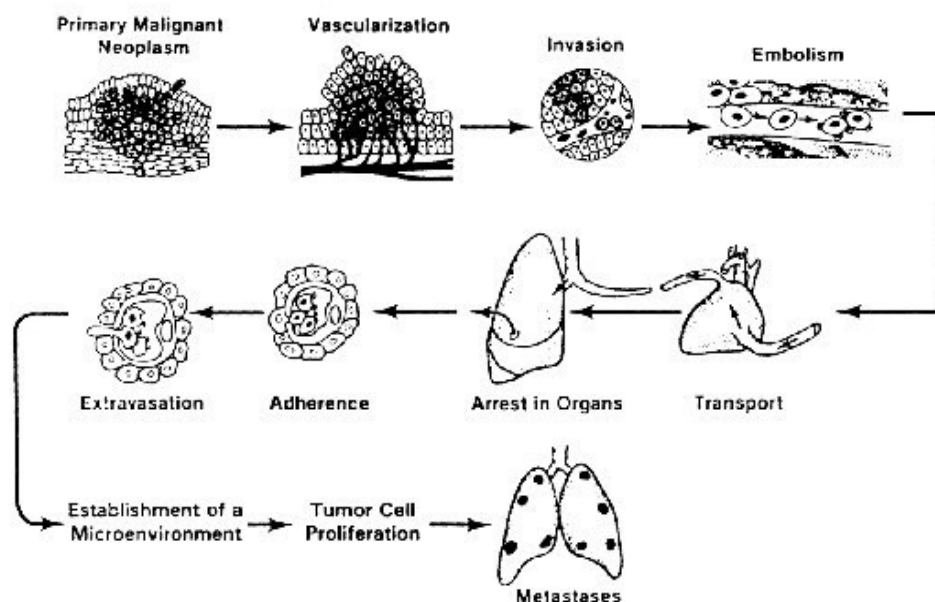
EVIDENCIA FUERTE	EVIDENCIA DEBIL	INCONSISTENTE
Factores ambientales	Factores ambientales	Factores ambientales
. Exposición al sol	. Bronceado UV.	
. Localización geográfica	. Obesidad.	
	. Empleo industrial	
Factores individuales	Factores individuales	Factores individuales
. Número de nevus.		
. Nevus displásicos.	. Historia de cancer cutaneo	
. Historia familiar de MC.	no melanoma (CCNM).	
. Inmunosupresión.	. Nivel socioeconómico alto.	. Embarazo
. Dificultad para broncearse.	. Pelo marrón.	
. Ojos azules o verdes.	. Sexo varón.	
. Pelo rubio o rojo.	. Hormonas endógenas	

**Tabla 1. Niveles de evidencia para cada factor de riesgo de melanoma.** Abreviatura: melanoma cutáneo (MC) (Markovic SN, 2007).



#### **4.2.2 Historia natural de la enfermedad**

En la historia natural de la enfermedad distinguimos tres períodos: periodo de inducción, periodo de progresión y diseminación de la enfermedad, los cuales abarcan los procesos que a continuación se describen. Después del evento de transformación inicial, el crecimiento de las células neoplásicas es progresivo. Una vascularización extensiva (angiogénesis) ocurre cuando la masa tumoral excede los 2 mm de diámetro. La síntesis y secreción de varios factores angiogénicos juegan un papel importante en establecer una red capilar al rededor del tejido invadido. La invasión del estroma en el cual esta localizado por algunas células tumorales ocurre mediante algunos mecanismos exclusivos. Las delgadas paredes de la vénula, tal como los canales linfáticos, son fácilmente penetradas por células tumorales y proveen una de las vías más comunes para la entrada de las células tumorales en la circulación. El agrupamiento y la embolización de pequeñas células tumorales ocurre después, y la vasta mayoría de células tumorales entran en la circulación donde son destruidas rápidamente. Las células tumorales que sobreviven la circulación deben ser atrapadas en los lechos capilares de los órganos. La extravasación es el siguiente paso, probablemente por los mismos mecanismos que influyen la invasión inicial, y el desarrollo de la vascularización y proliferación en conjunto con el parénquima del órgano completa la metástasis del mismo. Las células tumorales pueden invadir el estroma del huésped, penetrar los conductos sanguíneos y entrar en la circulación para producir metástasis adicional. El resultado del proceso depende de la interacción entre las propiedades intrínsecas de las células tumorales y de los factores del hospedero, los cuales varían dependiendo de cada individuo (Figura 1).



**Figura 1. Proceso de desarrollo y metástasis del melanoma (B16F10).**

### 4.2.3 Patogénesis del melanoma

La inmunología y la biología del melanoma pueden explicar por qué algunos tumores permanecen estables o silentes durante años, y por qué otros presentan agresividad desmesurada, y, también, por qué algunos tumores que tenían pronóstico desfavorable no presentan problemas mientras que otros con muy buen pronóstico inicial desarrollan un comportamiento muy agresivo, con invasión y metástasis.

Al expresar múltiples moléculas, el melanoma va adquiriendo la capacidad de crecimiento local y a distancia, induciendo alteraciones vasculares y en la matriz extracelular y, a la vez, alterando la respuesta inmunitaria que trata de contener su expansión. Resulta esencial la vigilancia que ejerce el sistema inmunitario sobre las células tumorales del melanoma para controlar las neoplasias incipientes. La capacidad metastásica podría ser consecuencia de los mecanismos que esas células tumorales desarrollan para escapar de control inmunológico (Figura 2). (Restrepo y Velásquez., 2012).

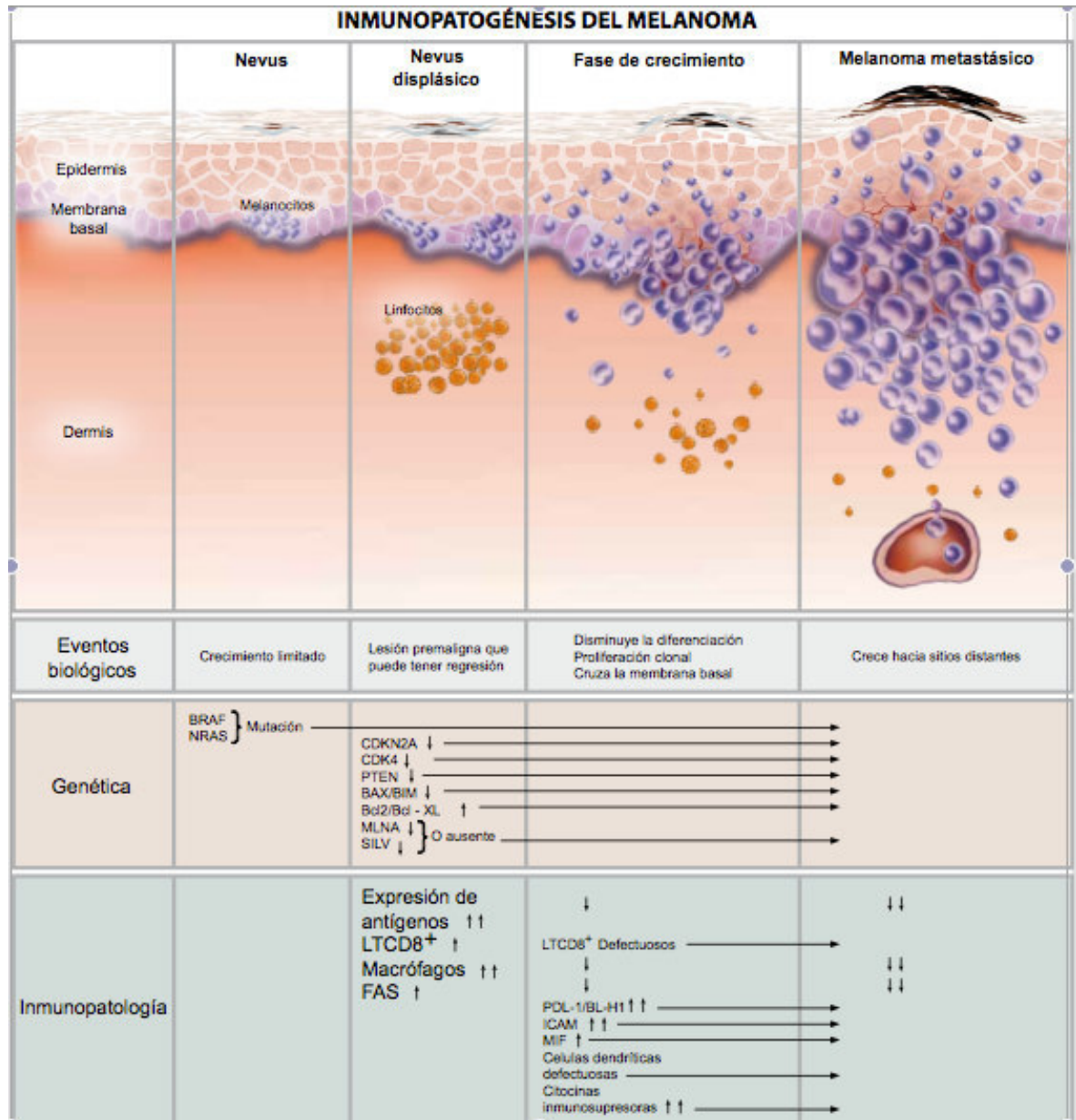


Figura 2. Inmunopatogénesis del melanoma. Catalina Restrepo y Margarita Velásquez, 2012.





### **4.3 Sistema inmunológico en cáncer**

El sistema inmunológico tiene tres roles primarios en la prevención de tumores. El sistema inmune puede proteger al hospedero de tumores inducidos por virus eliminando o suprimiendo infecciones virales. La temprana eliminación de patógenos y rápida resolución de la inflamación pueden prevenir el establecimiento de un ambiente inflamatorio conductivo a la tumorigénesis y por último, el sistema inmunológico puede identificar y eliminar células tumorales, siendo este último proceso referido como inmunovigilancia tumoral (Dunn *et al.*, 2002).

En 1990; se propuso la idea que hay un constante crecimiento de células transformadas en nuestros cuerpos y que el sistema inmune puede erradicarlas antes que ellas se manifiesten clínicamente, la inmunovigilancia ha sido un tópico controversial en la inmunología del tumor. A mediados de la década de los 20's se presentan evidencias experimentales donde demuestran que los tumores podrían ser reprimidos por el sistema inmune, estos experimentos sugirieron la existencia de antígenos asociados a tumores y formaron las bases de la inmunovigilancia, el cuál fue postulado por Burnet y Thomas Burnet (Burnet, 1957). Sin embargo, la idea de la inmunovigilancia del cáncer fue aceptada hasta 1990 cuando modelos de animales experimentales usando knock-out validaron la existencia de la inmunovigilancia del cáncer en tumores inducidos por químicos y tumores espontáneos (Dunn *et al.*, 2002).

A pesar del proceso de inmunovigilancia, los tumores se pueden desarrollar en la presencia de un sistema inmune funcional, y a raíz de esta situación surge el concepto de inmunoedición con la finalidad de explicar el papel del sistema inmune en el desarrollo del tumor (Dunn *et al.*, 2002). La inmunoedición del tumor es un concepto dividido en 3 fases: fase de eliminación, equilibrio y escape (Swann y Smyth, 2007). Siendo el fenómeno de regresión espontánea de lesiones de melanoma acompañadas por la expansión clonal de células T la fuerte evidencia para la fase de eliminación de la inmunoedición del cáncer (Ferradini *et al.*, 1993; Zorn and Hercend, 1999). La fase de eliminación del cáncer es el mismo proceso descrito en la teoría inicial de inmunovigilancia del tumor, donde el sistema inmune detecta y elimina células tumorales que se han desarrollado como resultado de una falla intrínseca de mecanismos supresores de tumor (Akslen and Naumov, 2008), esta fase se completa cuando las



células tumorales logran ser eliminadas en su totalidad por el sistema inmunológico. Sin embargo se puede dar el caso de una eliminación parcial del tumor, en donde se presenta un estado temporal de equilibrio entre el crecimiento de las células tumorales y la eliminación de las mismas por el sistema inmune. Durante este período las células tumorales permanecen en dormancia o acumulan cambios tales como mutaciones del DNA o cambios en la expresión de genes que pueden modular la expresión de los antígenos específicos de tumor y antígenos inducidos por estrés en las células. Mientras este proceso continúa, el sistema inmune puede inducir una presión selectiva para eliminar clones susceptibles a tumor. La presión inducida por el sistema inmune durante esta fase es suficiente para controlar la progresión tumoral, pero eventualmente, si la respuesta inmune falla para eliminar completamente el tumor, el proceso resulta en la selección de variantes de las células tumorales que son capaces de resistir, evitar o suprimir la respuesta antitumoral, propiciando la fase de escape (Koebel *et al.*, 2007). Un mecanismo desarrollado para inducir un estado de dormancia fue sustentado por los hallazgos de que el empleo de anti-CD4/CD8, anti-INF- $\gamma$ , o anti-IL-12 induce el escape del estado de dormancia de las células tumorales (Shankaran *et al.*, 2001), en la fase de escape tumoral el sistema inmune no es capaz de contener el crecimiento tumoral y el tumor crece progresivamente (Figura 3).

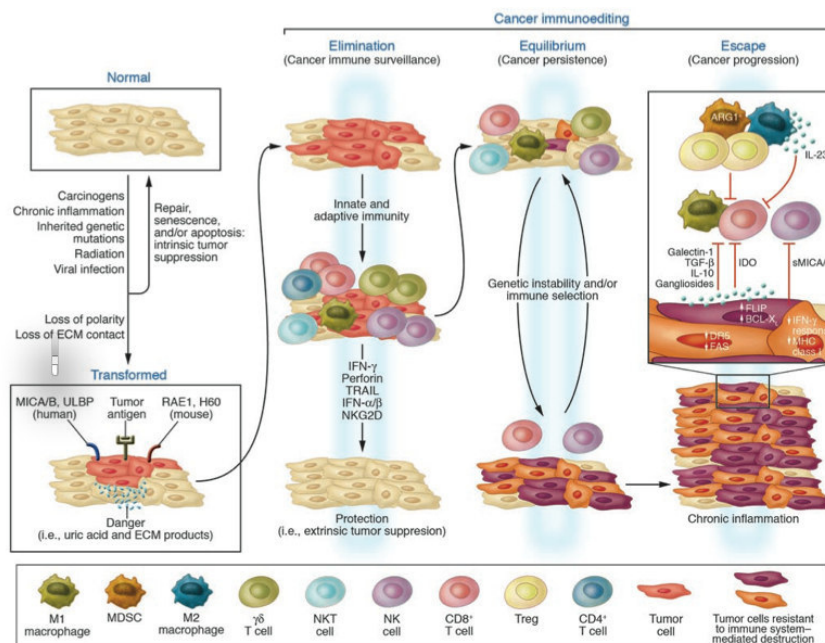


Figura 3. Supresión tumoral extrínseca por el sistema inmune.



#### 4.4 Mecanismos involucrados en el escape tumoral

Microambiente tumoral es definido como un sistema complejo en el cuál se involucran una gran cantidad de células, las cuales participan directa o indirectamente en la progresión del tumor, estas células, vasos, y moléculas presentes alrededor del tumor influyen al desarrollo de células tumorales. Algunos de los componentes involucrados en el microambiente tumoral pueden ser agrupados en 4 categorías; células cancerosas, células no cancerosas, factores solubles secretados y material sólido no celular, entre los que se incluyen matriz extracelular.

Muchos de los factores en el microambiente tumoral contribuyen al escape tumoral, incluyendo activación de células T en la ausencia de una estimulación apropiada, resultando en anergia (Schwartz, 2003); expresión de moléculas inhibitorias de células T tales como B7-H189 (Dong et al., 2002), HLA-G (Tripathi and Agrawal, 2006) y HLA-E por las células T (Derré et al., 2006); pérdida de antígenos tumorales o baja en la regulación de moléculas del MHC92 (Campoli et al., 2002); la presencia de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y células T restringidas a CD1d que suprimen la inmunidad antitumor (Terabe and Berzofsky, 2004); factores solubles supresores expresados por células tumorales; tales como TGF- $\beta$  (Chen et al., 2005; Gorelik and Flavell, 2001; Zhang et al., 2005), VEGF y gangliosidos (McKallip et al., 1999; Munn and Mellor, 2007); vías citotóxicas de resistencia a tumores como es observada en tumores con mutaciones en los genes codificantes de FAST (Takahashi et al., 2006), mutaciones en el gen codificante del receptor TRAIL receptor de muerte 5 (DR5) (Shin et al., 2001) y sobreexpresión de moléculas antiapoptóticas FLIP y BCL-XL (Kataoka et al., 1998; Shin et al., 2001), y expansión de poblaciones celulares mieloides supresivas, en este último caso se ha observado una expansión de células mieloides inmaduras reportadas en varios estudios y se asocia con una supresión de las respuestas de las células T tanto en humanos como en ratones.

Los tipos de células inmunes y funciones óptimas para controlar el crecimiento del tumor *in vivo* no han sido completamente identificados, por lo que una inmunoterapia efectiva del tumor es todavía incierta. Es claro que los tumores son capaces de hacer tolerante al sistema inmune propagando una variedad de influencias negativas que sirvan



para disminuir una inmunidad antitumoral efectiva. En la última década ha resurgido un interés por el estudio del mecanismo de tolerancia dominante mediada por la subpoblación llamada células T reguladoras debido a que se ha reportado su presencia en diferentes tipos de cánceres ejerciendo un efecto supresor antitumor por medio del sistema inmune y su participación en el desarrollo y progresión del tumor (Betts *et al.*, 2006).

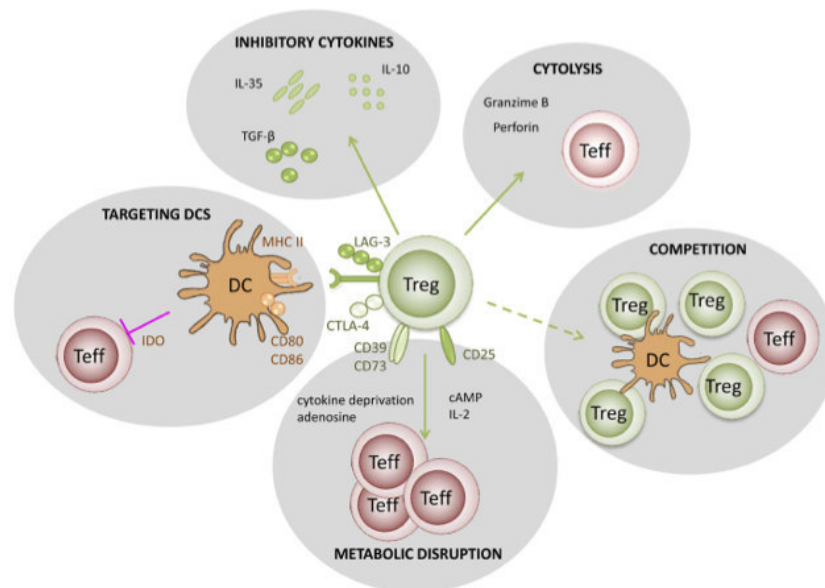
#### **4.5 Células T reguladoras**

Representan el 5% de células T CD4<sup>+</sup> circulantes en la sangre humana periférica, comprende distintos subsets celulares (Whiteside, 2014). Las células T reguladoras (Treg) naturales derivadas de timo o periféricas inducidas, son uno de los mecanismos alternativos de mantenimiento de la tolerancia en la periferia controlando la inmunidad autoreactiva efectora y la inmunidad hacia organismos y moléculas extrañas. Sin embargo aunque las células T reg en general benefician al hospedero se conoce su participación en la patogénesis del tumor proveyendo a los tumores con mecanismos para evadir la detección y destrucción por el sistema inmune, tanto en la inducción o reclutamiento de células Treg CD4<sup>+</sup> en el tumor (Buckner and Ziegler, 2004; Knutson *et al.*, 2007; Kronenberg and Rudensky, 2005; Redmond and Sherman, 2005).

La existencia de una subpoblación de células T que son especializadas en la supresión de las respuestas inmunes fue originalmente postulada en 1970, sin embargo el fenotipo y los mecanismos celulares y moleculares responsables de los efectos observados fue identificado a mediados de la década de los 90's identificando la expresión de la cadena  $\alpha$  del receptor de la interleucina 2 (CD25) sobre su superficie, observando que la depleción de esplenocitos CD25<sup>+</sup> seguida de la transferencia de células T CD25<sup>-</sup> al hospedero inmunodeficiente resultaba en un amplio espectro de enfermedades autoinmunes, mientras que la cotransferencia de células T CD25<sup>+</sup> podría prevenir la inducción de autoinmunidad. Estudios posteriores en una variedad de modelos animales demostraron la capacidad inmunosupresiva de este subgrupo de células T reg dentro del linaje de células T CD4<sup>+</sup> (Franzke *et al.*, 2006). Esta población



distintiva fue originalmente caracterizada en ratones, y  $CD25^{+}$  fue identificado como un marcador distintivo para el aislamiento de Tregs, representando 5-10% de células T  $CD4^{+}$  periféricas en sistemas de modelos murinos. Sin embargo, una población de células T reguladoras con propiedades fenotípicas y funcionales también había sido identificada en humanos, sin embargo en humanos la caracterización de células Treg no fue suficiente con la identificación del marcador  $CD25^{+}$ . Baecher y col., mostraron que entre la población de células T  $CD4^{+}CD25^{+}$  humanas, solo el 1-3%, que expresaban  $CD25^{+}$  (alto), controlaban la inmunidad interfiriendo la generación de funciones efectoras *in vivo* (Baecher-Allan *et al.*, 2001). Las células T reg median su capacidad de supresión a través de múltiples mecanismos. Diferentes subgrupos de Tregs inducen sus funciones inhibitorias a través de una manera dependiente del contacto célula-célula y/o vía factores solubles, mientras que la activación de Tregs es antígeno específica y requiere del señalamiento a través del TCR, la supresión de otras funciones efectoras de células T antígeno no específicas. Sin embargo, las moléculas involucradas en la supresión continúa siendo desconocida (Figura 4) (Dieckmann *et al.*, 2001; Levings *et al.*, 2001).



**Figura 4. Mecanismos inhibitorios de las células T reguladoras.**



Vlad G. y cols., refieren que el contacto directo de las células dendríticas/células T parece estabilizar la interacción entre Treg y células efectoras (Vlad *et al.*, 2005). Sin embargo la directa interacción modula el microambiente inmunosupresivo inhibiendo la maduración y funciones de presentación de antígeno de las células dendríticas interfiriendo también con el metabolismo del triptófano. Las células Treg naturales surgen en el timo posterior a la interacción con células dendríticas durante el proceso de selección negativa y poblan la periferia, sin embargo el preciso mecanismo de desarrollo de Treg en el timo y su migración hacia la periferia no está bien definido (Seddon and Mason, 2000).

**Las células Treg inducidas:** Además de las nTreg, existen varios tipos de Tregs inducidas. Estos tipos de células regulatorias difieren de las Treg naturales en la dependencia de la producción de citocinas pero no en su capacidad supresiva de respuestas proliferativas hacia la estimulación antigénica. Sin embargo no es claro si estos tipos de células reguladoras son derivadas de precursores comunes. Las células Tr1 producen altos niveles de IL-10 inmunosupresiva y pueden ser generadas por la activación crónica en la presencia de esta citocina en humanos y murinos (Dieckmann *et al.*, 2002). Este tipo de células son capaces de prevenir la colitis autoinmune en modelos experimentales. La inducción *in vivo* de células Th3 inmunoreguladoras productoras de TGF- $\beta$  han sido reportadas después de aplicaciones antigénicas orales o intravenosas. Este tipo de células se caracteriza por exhibir su propiedad inhibitoria independiente del contacto célula-célula (Thorstenson and Khoruts, 2001). Las células T CD4<sup>+</sup> vírgenes de sangre periférica se vuelven anérgicas por la estimulación aloantigénica en la presencia de TGF- $\beta$ . Un importante mecanismo es la inducción de células Treg por las células dendríticas inmaduras, el marcaje de las DCs es altamente dependiente en los estadios de maduración/activación y factores ambientales tales como citocinas proinflamatorias. Mientras que DCs diferenciadas pueden eficientemente activar el resto de células T (Jonuleit *et al.*, 2000).



#### **4.5.1 Tregs en tumores**

Los tumores podrían bloquear la generación de inmunidad tumoral específica de antígenos por la liberación de moléculas con actividad biológica, como por ejemplo citocinas o antígenos que incrementan el número de células Treg  $CD4^+$  en la circulación linfática o periférica. El incremento en los niveles de Tregs  $CD4^+$  en la sangre periférica de pacientes con cáncer comparada con la sangre de controles sanos han sido reportadas en una gran cantidad de cánceres como cáncer renal, de cuello, cabeza, pulmón, hígado tracto gastrointestinal, páncreas, mama, ovario y carcinoma nasofaríngeo, melanoma (Franzke et al., 2006). Diversos estudios han examinado las células  $CD4^+CD25^+$  sugiriendo que los pacientes con cáncer representan 13-52% del total de células T  $CD4^+$ , sin embargo cuando es confinado el análisis con la expresión de Foxp3 o CD25 alto el incremento es moderado encontrando entre 4-10% el cuál continua siendo alto en comparación con el 1-2% observado en la población sana (Cesana et al., 2006; Ormandy et al., 2005). Estudios muestran que en cánceres como cáncer gástrico, melanoma, endometrial y cervical se encuentran elevados niveles de Tregs en el drenaje de los nódulos linfáticos (Viguier et al., 2004). En melanoma los pacientes tienden a incrementar dos veces la frecuencia de Treg en nódulos linfáticos metastásicos comparados con nódulos linfáticos libres de tumor (Franzke et al., 2006).

Viguier y cols., observaron que las células  $CD4^+CD25^-$  de nódulos linfáticos tumorales liberaban IL-10, TGF- $\beta$  o ambas, sugiriendo que las células Treg son capaces de inducir mas células con actividad de células Treg por su capacidad supresora sin poseer el marcador característico de  $CD25^+$ , sugiriendo con este hallazgo la presencia de otras poblaciones de células Treg, dependientes o independientes del fenotipo característico  $CD4^+CD25^+$ .





#### 4.5.2 Marcadores moleculares de Treg

La caracterización y manipulación terapéutica de Treg naturales  $CD4^+CD25^+$  es facilitada por la identificación de marcadores específicos expresados exclusivamente en ellas. Se ha encontrado que las Treg  $CD4^+$  sobrerregulan la activación de varios marcadores y disminuye la regulación de proteínas que caracterizan a las células T naive (Franzke et al., 2006).

Existen gran cantidad de moléculas que se encuentran sobreexpresadas sobre la superficie de las células T regs, tales como GITR, CD103, LAG3, OX-40 y CTLA-4, sin embargo al igual que  $CD25^+$  no son exclusivas de ellas (Ferretti *et al.*, 2007). Por lo que la efectividad del uso de tratamientos enfocados en la molécula CD25 como un posible blanco terapéutico para eliminar Tregs se vuelve limitada por el hecho de que  $CD25^+$  es sobrerregulada en células T convencionales activadas. Por lo que hace que en la actualidad el único marcador clave para la identificación de T regs sea en ratones el factor de transcripción FOXP3 (Nair *et al.*, 2007). La integrina  $\alpha E\beta 7$  (CD103) ha sido recientemente descubierta como un posible marcador de Treg donde han revelado el papel de esta integrina en la inmunoregulación de la piel y artritis y ha sido postulada en la distinción de diferentes subgrupos de Treg  $CD103^+CD25^+$  expresando altos niveles de moléculas de adhesión y citocinas inflamatorias permitiendo su migración hacia los tejidos inflamados, de igual manera convirtiendo células  $CD4^+$  en células parecidas a Tr1 productoras de IL-10 (Huehn *et al.*, 2004, 2004; Stassen *et al.*, 2004). Recientes estudios también muestran a neurofilina-1 (Nrpl) como un marcador específico para células Treg murinas. Nrpl es altamente expresado en estas células bajo diversas condiciones y no es sobrerregulado por la estimulación del TCR. La expresión ectópica de Foxp3 sobrerregula la expresión de Nrpl, sugiriendo que su expresión es ligada a eventos genéticos con Foxp3 en las Treg. Debidos a su expresión sobre la superficie de Tregs, Nrpl es un excelente marcador, si embargo un anticuerpo monoclonal es requerido. Las células Treg humanas difieren de Treg murinas por el hecho que ellas no expresan Nrpl indicando diferencias entre las Treg humanas y murinas (Abad *et al.*, 2010; Loser *et al.*, 2005).





Es conocido que las células Treg expresan el factor de transcripción forkhead box P3 (Foxp3) en altos niveles el cuál cuando es mutado induce a una inmunidad fatal en ratones y un síndrome severo referido como disregulación inmune, poliendocrinopatía, enteropatía y síndrome ligado a X (IPEX) en humanos. Existe una gran evidencia que Foxp3 es un regulador principal de Tregs y es esencial para su desarrollo y función (Fontenot *et al.*, 2003). Foxp3 se considera a la fecha el único marcador de células T reguladoras, capaz de distinguirlas de células T activadas  $CD4^+CD25^-$ , sin embargo otros estudios han demostrado que Foxp3 es específicamente requerido para el desarrollo de células T reguladoras  $CD4^+CD25^+$  y es suficiente para activar una serie de funciones supresoras en células T no reguladoras  $CD4^+$  en periferia. Debido a estos criterios, Foxp3 es un gen maestro regulador para el importante subgrupo de células Treg. Foxp3 ejerce un mecanismo dominante de regulación negativa en el sistema inmune. La expresión ectópica de Foxp3 en periferia sobre las células T  $CD4^+CD25^-$  abre nuevos caminos para terapias basadas para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y prevención de rechazos a transplantes usando líneas de células T transfectadas con Foxp3 auto y aloantígeno específicas. Por lo que el conocimiento de la expresión de Foxp3 y función podría tener profundas implicaciones para el entendimiento de las funciones inmunes en la salud y enfermedad (Fontenot *et al.*, 2003).

Altos niveles de Treg han sido reportados en sangre periférica, nódulos linfáticos, tumores de pacientes con diferentes tipos de cáncer, sugiriendo el papel de estas células en la progresión del cáncer. Varios estudios describen recientemente la expresión de Foxp3 en células no-hematopoyéticas, incluyendo células del epitelio normal y células de cáncer de múltiples linajes y diferente origen de tejido.



## 4.6 FOXP3

FOXP3 es un miembro de la familia Forkhead (FKH)-Winged hélix family of transcription factors y se cree que actúa como un represor transcripcional. El nombre del dominio “forkhead” (FKH) se deriva del producto del gen forkhead (fkh) en *Drosophila melanogaster*, indispensable para la diferenciación terminal del embrión; la estructura de este dominio FKH fue identificada posteriormente en un grupo de factores de transcripción hepáticos con dominios de unión al DNA hallazgo que dio lugar a la conformación del grupo de factores de transcripción con dominios FKH, los cuales están presentes en diversos organismos, desde levaduras hasta humanos.

Bajo la dominación de FOX se designan los factores de transcripción con dominio forkhead en los vertebrados, clasificados en base a su estructura. Los factores de transcripción FOX con acción en el sistema inmune son FOXJ1, FOXN, FOXO3A y FOXP3. FOXP3 pertenece a la subfamilia FOXP, que incluye a FOXP1, FOXP2, FOXP3 y FOXP4. FOXP1 ha sido implicado como un gen supresor de tumores, puesto que la pérdida de su función se asocia a trastornos linfoproliferativos, y diversos tipos de cáncer (pulmón, mama, estómago). FOXP2 es involucrado en trastornos de lenguaje y neuronal, FOXP3 en la generación y función de las células reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y FOXP4 se ha asociado al desarrollo de la corteza cerebral anterior en modelos murinos. El dominio FKH de FOXP3 está localizado muy cerca del extremo carboxiloterminale de la proteína, lo que sugiere que carece de dominio transactivador y lleva a postular que podría actuar como represor transcripcional. Entre las evidencias para proponer que FOXP3 actúa principalmente como inhibidor de la transcripción se encuentra que, primero, las células T de los ratones scurf (deficientes de FOXP3) presentan un estado constante de hiperactivación e hiperrespuesta a la estimulación a través de TCR, segundo, las células T de los ratones transgénicos para FOXP3 presentan pobre respuesta a la estimulación del TCR, proliferan poco y producen bajas cantidades de IL-2 y tercero, la sobreexpresión de FOXP3 en células Jurkat, una línea de células T de leucemia humana, inhibe la transcripción de IL-2 por mecanismos posiblemente competitivos, debido a que el sitio de unión de FOXP3 en el promotor de IL-2 se sobrepone al de NFAT, uno de los factores de transcripción más importantes para IL-2. Análisis del genoma de *Foxp3* indica que tiene la capacidad de unirse a 700 genes y



gran cantidad de miRNA's encontrando que Foxp3 puede activar o reprimir estos genes en células Treg, indicando un papel dual.

Otros efectos de inhibición son reportados por Betelley y Cols, quienes describen que Foxp3 suprime la producción de IL-2, IL-4 e INF- $\gamma$  por mecanismos que incluyen asociación a los factores de transcripción de la familia Rel, NF $\kappa$ B y NFAT y el bloque de su unión a los promotores de las citocinas mencionadas. Por otro lado se identificaron sitios potenciales de unión de FOXP3 en los promotores de los genes que codifican IL-4 y TNF- $\alpha$  y GM-CSF (Factor estimulante de colonia granulocito-monocito), citocinas cuya relación está alterada en ratones scurfy, sin embargo, las consecuencias funcionales de estas observaciones no han sido completamente determinadas. Además de lo anterior, también se ha propuesto que FOXP3 podría ejercer efectos transactivadores. La transfección de FOXP3 a células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> se asocia con la adquisición de la función y fenotipo de las células reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, que incluye CTLA-4, GITR y CD25<sup>+</sup>; se postula que FOXP3 podría inducir la transcripción de genes de estas moléculas, pero aún se desconoce cuales son los mecanismos (González Parías *et al.*, 2010).

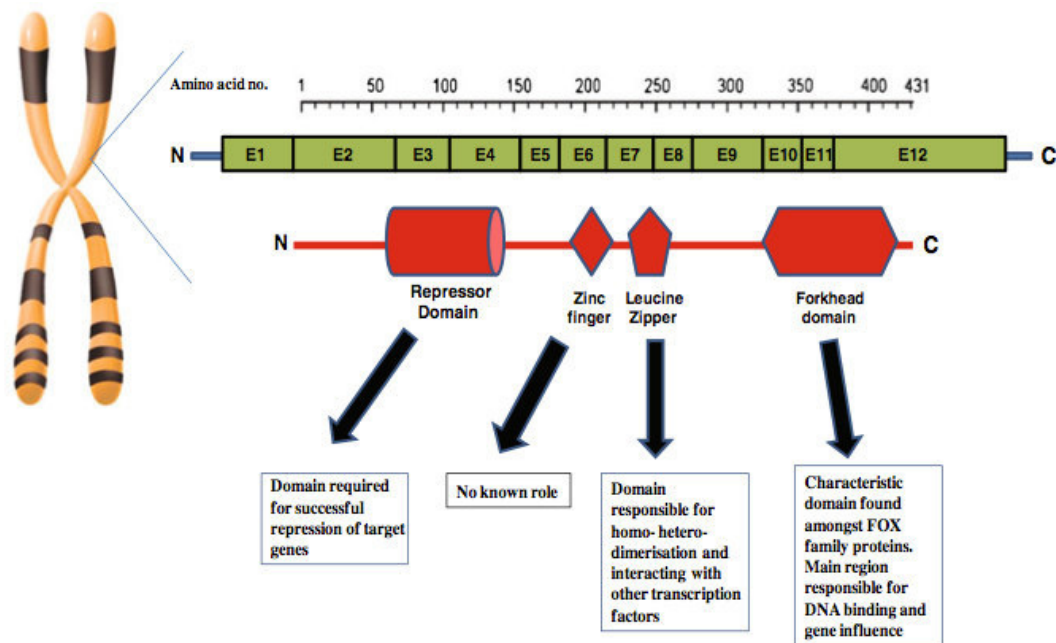
#### **4.6.1 Estructura del gen FOXP3**

El gen FOXP3 posee 11 codones y 3 exones no codificantes. Los 2 extremos 5' de exones no codificantes (-2a y -2b) son separados por 640 pb, y estos 2 exones presentan un splicing común hacia el segundo exón no codificante (-1). El exón -2b y -1 son separados por aproximadamente 5000 pb y posee varios elementos-cis regulatorios. Se ha visto que una inserción de 2 pb en el exón 8, localizado río arriba del dominio FKH, resultando en un codón de término prematuro, resultando un producto de gen truncado, perdiendo el dominio funcional del C-terminal e induciendo ratones scurfy (Figura 5) (Smith *et al.*, 2006).

FOXP3 es altamente conservado en bovinos, caninos, felinos, murinos, macacos y humanos. Sin embargo, la secuencia de la proteína en humanos (número de gen NP\_054728) y ratón (número de gen NP\_473380) poseen 86% de identidad y 91% de



similitud en sus aminoácidos. El análisis por Western Blot muestra que las células humanas expresan 2 isoformas. Una banda superior es similar a la de FOXP3 murino, mientras que la banda inferior es exclusiva de humanos y pierde el exón 2 (aminoácidos del 71-105), los cuales son parte del dominio represor en la proteína FOXP3. Esta región interactúa y reprime la función del receptor- $\alpha$  orfano relacionado al ácido retinoico (ROR- $\alpha$ ) y ROR- $\gamma$ t. La expresión de FOXP3  $\Delta$ exon2 en células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> en humanos induce a una mayor secreción de IL-2 y proliferación en respuesta a la estimulación del TCR comparada con la longitud completa de FOXP3, por lo que se ha propuesto que esta isoforma actúe como un FOXP3 mutante dominante negativo. Las células Treg humanas también expresan una tercer isoforma, la cuál pierde ambos exones 2 y el exón 7 (aminoácidos del 239 al 260). El exón 7 codifica para un motivo de zipper de leucina que actúa como un elemento estructural de dimerización. Sin embargo, se ha reportado que la ausencia del exón 7 en FOXP3 natural  $\Delta$ 2 $\Delta$ 7 no afecta la dimerización pero sustituye la función supresiva de la función de Tregs (Lal and Bromberg, 2009).



*Figura 5. Estructura de Foxp3 (Douglass et al., 2012).*



## Correlación entre la expresión de Foxp3 y desarrollo de cáncer

Para determinar si Foxp3 pudiera estar expresado por los tumores y su posible papel biológico (Tabla 2), una gran cantidad de estudios han sido realizados usando líneas celulares de cáncer. Karanikas y cols., en el 2008 examinaron la expresión del mRNA de Foxp3 y su proteína en 25 líneas celulares de cáncer, incluyendo pulmón, colon, mama, melanoma, leucemia eritroide y células de leucemia, encontrando en las líneas tumorales niveles de expresión de Foxp3 siendo mas altos que en fibroblastos y células B EBV transformadas. La expresión más alta fue encontrada en las células MCF-7 de cáncer de mama al ser comparada con la clona de células Treg examinada, todas las células mostraron diferentes perfiles en tinción de Foxp3, con localización subcelular heterogénea. Este estudio mostró que la expresión de Foxp3 no es restringida particularmente a un tipo de tumor. (Karanikas *et al.*, 2008).

Posteriores análisis por Ebert y cols., empleando citometría de flujo corroboró la expresión de Foxp3 en un panel de células tumorales derivadas de colon, pulmón, mama, riñón revelando una expresión en al menos una de las líneas celulares derivadas de los tumores mencionados (Ebert *et al.*, 2008).

Datos obtenidos de modelos murinos mostrados por Zuo y cols., encontraron que Foxp3 reprime varios oncogenes (Zuo *et al.*, 2007). Principalmente se ha encontrado que Foxp3 se une y reprime promotores de HER2 y SKP2 en ratones (células TSA transfectadas con foxp-3) y en células epiteliales mamarias de humano. Otros resultados mostrados por Wang y cols., en el 2009 mostraron que Foxp3 es necesario y suficiente para reprimir c-MYC, el oncogén más sobreexpresado en cáncer de próstata e importante en varios procesos celulares incluyendo progresión del ciclo celular y apoptosis. La introducción del cDNA de Foxp3 en células MCF-7 o silenciamiento de Foxp3 en células epiteliales de próstata HPEC reprimieron la formación de colonias, resultando en inhibición del crecimiento y efectos pro-apoptóticos *in vitro*, mostrando también que la expresión de Foxp3 es esencial para la expresión de genes supresores de tumor p21 y LATS2, inhibiendo la unión de la histona deacetilasa (HDAC2 y HDAC4) a el promotor p21, Foxp3 induce expresión de p21, el cuál actúa arrestando las células específicamente en la fase G1 del ciclo celular (Liu *et al.*, 2009). Además, la unión



directa de Foxp3 al promotor LATS2 induce su expresión y la consecuente degradación de YAP (Li *et al.*, 2011), una molécula en la vía Hippo con un rol en la regulación de la proliferación celular y apoptosis (Harvey and Tapon, 2007).

McInnes y cols., en el 2012, mostró que Foxp3 en las células BT549 de carcinoma de mama pueden suprimir la expresión de SATB1, un oncogén implicado en metástasis (McInnes *et al.*, 2012). En otros experimentos Zang y Sun en el 2010, encontraron que la introducción de cDNA de Foxp3 en células de cáncer de ovario SKOV3, las cuales expresaron niveles basales de Foxp3 sin la detección de la proteína, inhibieron proliferación celular, decrecieron migración y reducción de invasión posiblemente disminuyendo la expresión de MMP2 y el activador de plasminógeno tipo-uroquinasa (Zhang and Sun, 2010).

Junto con todos los antecedentes anteriores, los datos derivados de estos estudios *in vitro* abordan un punto crítico del papel que desempeña Foxp3 como un supresor de tumor en al menos modelos de cáncer de mama, próstata y ovario.

En contraste al papel onco-supresor de Foxp3, existen evidencias de estudios de muestras de cáncer humano que muestran su acción pro-metastásica *in vivo*, basados en la correlación de la expresión de Foxp3 por las células tumorales y un pobre pronóstico. Recientes datos sugieren que Foxp3 es expresada en células de carcinoma en todos los tipos de cáncer excepto en carcinoma de ovario; sin embargo la expresión de Foxp3 ha sido observada mediante inmunohistoquímica en el epitelio de ovario de mujeres sanas pero no ha sido detectado en las células tumorales (Zhang and Sun, 2010). En células epiteliales de próstata, la tinción nuclear de Foxp3 fue observada en todas las muestras de tejidos de próstata normales y benignos, pero también en 30% de muestras de pacientes con cáncer prostático (Wang *et al.*, 2009).

La sobreexpresión del mRNA de Foxp3 fue detectada en 13 pacientes con adenocarcinoma pancreático (Karanikas *et al.*, 2008). Además la expresión de Foxp3 fue detectada por inmunohistoquímica en 24 de 39 células tumorales de pacientes con carcinoma pancreático (Hinz *et al.*, 2007). Muchos estudios han sugerido el papel de Foxp3 en la diseminación del tumor hacia órganos distantes. Por ejemplo, análisis de



inmunohistoquímica demuestran que 24 de 39 pacientes con carcinoma pancreático, en el cual la tinción de Foxp3 subcelular fue frecuentemente a nivel citoplasmático en algunos pacientes, pero predominantemente nuclear en otros; células del ducto pancreático normal fueron negativos para la expresión de Foxp3. Merlo y cols., en el 2008 encontraron mediante un análisis de inmunohistoquímica de muestras de pacientes con cáncer de mama la expresión de Foxp3 en células tumorales como un factor pronóstico fuertemente independiente para la metástasis, pero no como riesgo de recurrencia. Análisis multivariados revelaron la expresión de Foxp3 y nódulos linfáticos positivos. En muchos de los carcinomas, la tinción de Foxp3 fue predominantemente localizada en el citoplasma, sin embargo tanto la tinción nuclear y citoplásmica estuvo presente en algunos especímenes y pocos mostraron solo la presencia a nivel nuclear. Análisis de sobrevivencia de acuerdo a la localización de Foxp3 revelaron un peor pronóstico en muestras mostrando su presencia a nivel citoplásmico/nuclear comparado con muestras negativas. En contraste, Ladoire y cols., en el 2011, reportaron que la detección de Foxp3 en el citoplasma de células con cáncer de mama de pacientes con una sobreexpresión de HER-2 tratados con quimioterapia neoadyuvante fue asociada con un mejor pronóstico y sobrevivencia (Ladoire *et al.*, 2011b).

La expresión de Foxp3 fue analizada utilizando RT-PCR tiempo real en 116 muestras de cáncer de mama Wolf y cols., encontraron una significativa correlación entre la expresión de Foxp3 y la aparición de metástasis en nódulos linfáticos (Wolf *et al.*, 2007). Winerdal y cols en el 2011 encontraron que la expresión del mRNA de Foxp3 en células tumorales de vejiga se asocia con baja sobrevivencia, sin existir una diferencia significativa observada entre los grupos de tinción citoplásmica, nuclear y citoplásmica/nuclear en términos de sobrevivencia de los pacientes (Winerdal *et al.*, 2011). La expresión de Foxp3 en células tumorales es asociada con diferenciación patológica y estadio de células T, y es un factor pronóstico negativo independiente para la sobrevivencia de los pacientes el cual no es asociado con recurrencia local, confirmando que Foxp3 puede inducir metástasis.

Un estudio por Tao y cols., en el 2012 en células de cáncer de pulmón no-pequeñas (NSCLC) revelaron la expresión de Foxp3 en 31% de los pacientes. Mientras que la expresión citoplásmica de Foxp3 en cáncer de pulmón *per se* no fue asociada con otros





nódulos linfáticos positivos o con supervivencia en este estudio, mientras que otros estudios con análisis de inmunohistoquímica de tejido NSCLC en el cual la tinción de Foxp3 fue consistentemente nuclear fue fuerte en células tumorales que en epitelio bronquial normal, encontrando una correlación entre la positividad de Foxp3 en células de cáncer y metástasis en nódulos linfáticos (Dimitrakopoulos *et al.*, 2011). En muestras de tumor gástrico, donde la tinción de Foxp3 fue detectada en el núcleo de células epiteliales peritumorales y en el núcleo/citoplasma de algunas células de cáncer gástrico, la frecuencia de células de cáncer Foxp3 positivas incremento en tumores primarios (58.2%) comparados con el grupo control de pacientes con cáncer gástrico crónico (26.7 %) y es correlacionado con la incidencia de metástasis de nódulos linfáticos (Wang *et al.*, 2010).

Una correlación entre la expresión de Foxp3 y metástasis de nódulos linfáticos fue reportada en carcinoma escamoso de esófago, donde el mRNA de Foxp3 y la expresión de la proteína no fue solamente alta en tumores en comparación con mucosa aparentemente normal, si no que también fue alta en estadios (IIB y II) avanzados de la enfermedad que en estadios tempranos (I y IIA) (Wang *et al.*, 2010).

Fue encontrado mediante inmunohistoquímica la expresión de Foxp3 en células de melanoma humano pero no en melanocitos normales (Ebert *et al.*, 2008), siendo consistente estos hallazgos con los resultados de Quaglino y cols (Quaglino *et al.*, 2011).

Como se ha mencionado en muchos estudios *in vitro* y en modelos murinos Foxp3 actúa como un supresor de tumor en cáncer de mama, próstata y ovario, mientras que estudios de inmunohistoquímica han revelado una fuerte asociación entre la expresión de Foxp3 en células tumorales y metástasis. Esta aparente discrepancia podría ser explicada por una pérdida de la función oncosupresiva en tumores humanos debido a mutaciones o al contrario. Por otra parte, Foxp3 podría ser funcional y tener un papel primordial regulando proliferación y metástasis de las células tumorales. En este caso, resultados obtenidos en modelos murinos, que se basan en el papel de Foxp3 en inhibición de proliferación, podría ser explicado con la relevancia de su papel anti-proliferativo durante las fases iniciales del crecimiento del tumor. La función pro-metástica podría incrementarse en casos que Foxp3 es expresado en estadios tardíos, en los cuales una posible transformación perjudica su habilidad anti-proliferativa. En resumen esta





supuesta función inmunosupresiva podría contribuir a inducir la progresión del cáncer. En conclusión, *Foxp3* posee un papel amplio y potencial mecanismo de acción molecular en las células de cáncer que aun permanece sin dilucidarse. Por lo que consiguientes estudios utilizando modelos *in vitro* e *in vivo* son necesarios para examinar su papel en células de cáncer. El descubrimiento de genes y/o funciones celulares así como funciones pro-metastásicas reguladas por *Foxp3* en células de tumor podría proveer la explicación de su papel en el cáncer proponiendo terapias blanco específicas *in vivo*. Sin embargo, se tiene que tomar en cuenta que *Foxp3* no es un blanco principal terapéutico debido a que desempeña un papel esencial en la regulación de la autoinmunidad. La identificación de moléculas que regulan la expresión de *Foxp3* y son expresadas en las células tumorales y no en Tregs podría proveer el desarrollo de nuevas estrategias para la identificación de blancos terapéuticos que no sean específicas de *Foxp3* (Ladoire *et al.*, 2011).

#### 4.7 INTERLEUCINA 2

Interleucina 2 (IL-2), fue originalmente descubierta como un factor de crecimiento para las células T *in vitro*. IL-2 es una glicoproteína monomérica secretada de 15 kDa. Existe como una citocina globular de estructura de 4  $\alpha$ -hélices en una configuración típica de citocinas de tipo I. Respuestas a la IL-2 son mediadas a través de su interacción con el complejo trimérico de alta afinidad IL-2R (CD25, CD122, CD132). Ausencia de estas cadenas induce una nula señalización. Estimulación del receptor por IL-2 induce activación de STAT5. La administración de IL-2 está aprobada por la FDA para el tratamiento de melanoma y carcinoma renal. Sin embargo, no es bien conocido porque solo el 5-15% de los pacientes responden a esta terapia, además que una elevada toxicidad se observa al administrarse como tratamiento. IL-2 también ha sido administrada en pacientes con HIV avanzado e induce un significativo incremento de células TCD4<sup>+</sup>. Células T CD4<sup>+</sup> expandidas con IL-2 expresan niveles intermedios de CD25 al igual que moderados niveles de *Foxp3* que podrían inducir a las Treg. A pesar de administrar IL-2 y observar un incremento de células T CD4<sup>+</sup> en estos pacientes, no se han observado beneficios clínicos, como reducción del riesgo de enfermedades



oportunistas o muerte al ser comparado con pacientes que solo han recibido terapia anti-retroviral sola. Algunos de los efectos benéficos del tratamiento con IL-2 de pacientes con melanoma metastásico o carcinoma renal fueron ampliamente mediados por el potenciamiento de la función y/o número de linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

Mientras que existen aun dudas sobre el papel de IL-2 en la expansión/diferenciación de células T CD8<sup>+</sup> *in vitro* e *in vivo*, su efecto sobre T CD4<sup>+</sup> es menos claro, *in vivo* ha sido demostrado que la deficiencia de IL-2, CD25 o CD122 desarrolla manifestaciones de autoinmunidad sistémica y enfermedades linfoproliferativas fatal (Malek and Bayer, 2004).

Se ha observado que el número de Tregs en periferia de ratones deficientes de IL-2, IL2-R $\alpha$  e IL-2R $\beta$  son disminuidos hasta casi ser ausentes. El tratamiento con anti-IL2 en ratones normales o con CTLA-4Ig para inhibir señales de coestimulación inducen una rápida disminución en el número de células T Foxp3<sup>+</sup> (Setoguchi *et al.*, 2005). La IL-2 no es solo requerida para la sobrevivencias de Tregs Foxp<sup>+</sup> en la periferia, si no que son críticas para el mantenimiento de sus funciones supresivas. La expresión de Foxp3 en células Treg es requerida para establecer un programa en la expresión del gen que ofrece a las Treg una dependencia de la señalización paracrina de IL-2 que a su vez reprime a la producción de IL-2 por las Treg e induce IL-2R $\alpha$ . Las células Treg son la primer población que responde a la IL-2 producida por las células T efectoras durante las respuestas inmunes (O’Gorman *et al.*, 2009). El descubrimiento de los efectos de IL-2 sobre las células Treg incrementó el cuestionamiento del efecto de altas dosis de IL-2 sobre las Treg de pacientes con cáncer Ahmadzadeh y Rosenberg; demostraron que el tratamiento con IL-2 resultó en un incremento de 6 veces más en la frecuencia de células con expresión alta de CD25 en la sangre periférica comparada con niveles del pretratamiento y las Treg expandidas tuvieron un efecto supresor *in vitro* sugiriendo que las células Treg mediadas por IL-2 podrían contribuir a la pérdida de la respuesta objetiva de la terapia con IL-2 en la mayoría de los pacientes con melanoma y cáncer renal (Ahmadzadeh *et al.*, 2007).

Se tienen antecedentes que muchas tipos de células de cáncer expresan el receptor de IL-2 (IL-2R); sin embargo, se tienen pocas publicaciones sobre el posible papel de su



receptor. Se conoce que células de cáncer cervical no solo expresan el receptor de IL-2, si no que producen y secretan IL-2. Se ha mostrado que empleando anticuerpos anti-IL-2R, la proliferación de estas células es inhibida, sugiriendo que las células adquieren una dependencia parcial sobre este factor para su proliferación. Se hipotetiza que las propiedades adquiridas por las células tumorales para usar IL-2 para su propia proliferación podría resultar en un mecanismo de competición con linfocitos para este factor de crecimiento. En consecuencia, se supone que el uso de IL-2 por las células tumorales eliminaría esta citocina en el sitio del tumor, siendo este un factor de crecimiento necesario para la actividad citotóxica de linfocitos infiltrantes de tumor. Por lo que es necesario evaluar las diferencias en constantes de disociación, señales de transducción que posee el receptor de IL-2 tanto en células de cáncer como en linfocitos para el mejor entendimiento de la posible existencia de un mecanismo de competición entre los dos tipos celulares para la IL-2. Se ha determinado que las líneas celulares de cáncer CALO e INBL expresan el receptor de c-kit y que la IL-2 exógena incrementa esta expresión, y que cuando este correceptor es coexpresado con IL-2R la cantidad de IL-2 necesaria para inducir proliferación disminuye. Por lo que se tiene como expectativa que el mecanismo de competencia entre las células de cáncer de cérvix y linfocitos podría estar a favor a las células malignas debido a que ellas necesitan menos de este factor de crecimiento para su proliferación (Rangel-Corona et al., 2010).

Se ha identificado por citometría de flujo y Northern Blot que las células de melanoma murino B16F10 expresan el receptor de IL-2- $\alpha$ , y el gen de IL-2, sin embargo en sobrenadantes de las células B16F10 no es detectable la actividad de IL-2. Con estos datos García de Galdeano y cols., concluyen que el sistema de señalización de IL-2 está presente en las células B16F10 y que la IL-2 favorece la proliferación celular de las células B16F10, sugiriendo el papel de esta citocina en la actividad tumoral de estas células (García de Galdeano *et al.*, 1996).



## **4.8 CD25 Receptor de Interleucinas 2**

El receptor de interleucina 2 (IL-2R) es expresado en células B, T, NK y eosinófilos y también se ha observado su expresión en células tumorales. El receptor de IL-2 está compuesto de las cadenas, alfa (IL-2R $\alpha$ , CD25), beta (IL-2R $\beta$ , CD122) y gamma (IL-2R $\gamma$ , CD132). Para ser un receptor de alta afinidad se requieren las tres cadenas, las subunidades IL-2R $\beta$  y  $\gamma$ c componen el receptor de afinidad intermedia, mientras que IL-2R $\alpha$  solo representa el receptor de baja afinidad.

IL-2R $\alpha$  (CD25) es un polipéptido de 55 kDa con un dominio extracelular (219 aminoácidos), dominio transmembrana (19 aminoácidos) y dominio citoplásmico (13 aminoácidos). Es conocido como la tercera cadena de IL-2R trimérico, aparentemente no parece participar en señalización, sin embargo incrementa la afinidad del IL-2R a su ligando. Altos niveles de este receptor trimérico son expresados temporalmente por células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> seguida de la activación por el TCR. Sin embargo otras células expresan constitutivamente altos niveles de CD25. Las células Treg expresan constitutivamente altos niveles de CD25, con niveles intermedios de CD122 y la cadena  $\gamma$ c. La expresión de CD25 por las células T es regulada por la estimulación del TCR y por el contacto con IL-2, el cual provee un feedback positivo que involucra la unión de la señal transductora y activadora del factor de transcripción STAT 5 al locus del gen CD25 (Boyman and Sprent, 2012).

En células convencionales, posterior a la unión de IL-2, la heterodimerización de las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ c desencadenan la activación y reclutamiento de Janus Kinasa (Jak), el cual fosforila residuos de tirosina sobre el dominio citoplasmático de la cadena  $\beta$ . Específicamente, Jak1 es reclutado a dominios ricos de serina de la cadena  $\beta$  mientras que jak3 se une al dominio citoplasmático de  $\gamma$ c. Las tirosinas fosforiladas sirven como sitios de unión para las proteínas adaptadoras como para STAT5. Proteínas SHC eventualmente inducen la activación de las vías Ras-Raf-MAP Kinasa y PI3K, las cuales promueven la transcripción de citocinas, sobrevivencia, entrada al ciclo celular y crecimiento. Posterior a la activación por tirosinas fosforiladas, STAT5 dimeriza y se transloca al núcleo donde se une a sitios de unión al DNA uniéndose a sitios que contienen sitios activados de interferón- $\gamma$  (GAS), donde es responsable para la proliferación celular y regula la expresión de genes mitogénicos y de sobrevivencia. El



promotor de IL-2R $\alpha$  es también un blanco de STAT5 e incluye tres regiones regulatorias positivas (PRR, PRRI y PPRII) (Lan *et al.*, 2008).

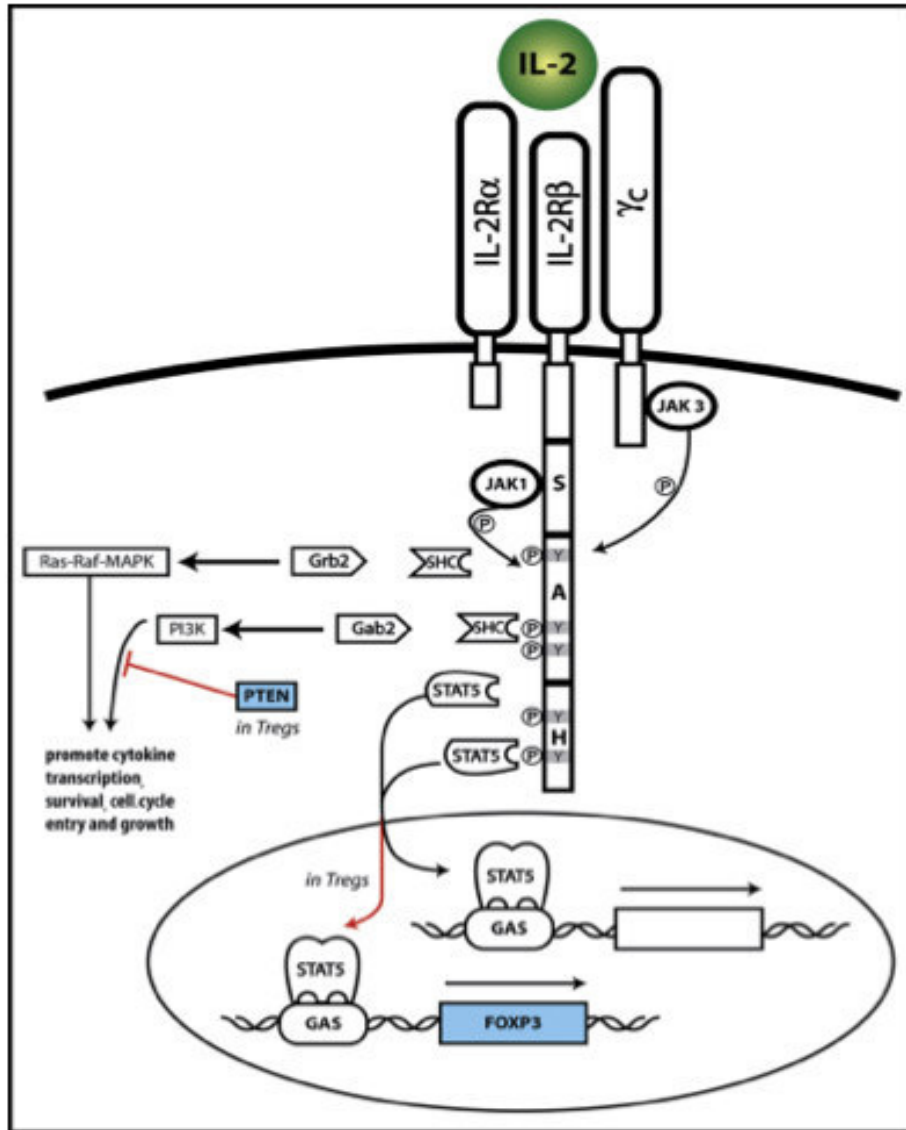
Seguido de la unión del receptor al complejo cuaternario IL-2-IL-2R es rápidamente internalizado e IL-2, CD122 y  $\gamma c$  son subsecuentemente degradados; en contraste con CD25 que es reciclado hacia la superficie celular (Malek, 2008).

Sin embargo el efecto de IL-2 permanece sin ser totalmente identificado en el contexto de las células T reguladoras. Se ha observado que las Treg murinas no exhiben las vías PI3K posterior a la estimulación con IL-2 *in vitro*; sin embargo, STAT5 es activada. La pérdida de activación de PI3K es atribuida a la expresión de PTEN, el cual es reportado para regular la capacidad proliferativa de las células T. Tanto las células nativas y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg expresan PTEN posterior a la estimulación de IL-2, en contraste con las células efectoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. La expresión de PTEN es disregulada posterior a la estimulación a través del TCR en las Treg. Por otra parte, igual que las células T no reguladoras, STAT5 es retenida en las células Treg. Interesantemente, sitios de unión de STAT5 han sido encontrados en el gen de *Foxp3* de ratones y humanos (Bensinger *et al.*, 2004).

La expresión constitutiva alta de CD25 es una característica principal de células Treg naturales *Foxp3*<sup>+</sup>. En las células Treg, la expresión de *Foxp3* reprime la transcripción de IL-2 y activa CD25, haciéndolas altamente dependientes de IL-2 exógena para su mantenimiento en la periferia (Setoguchi *et al.*, 2005). La deficiencia de IL-2, CD25 produce enfermedades fatales de autoinmunidad e inflamatorias, las cuales es debido a la deficiencia de sobrevivencia de las células Treg naturales. En humanos, la deficiencia de CD25 exhibe severa autoinmunidad y alergias resultado de la deficiencia o disfunción de células T reg *Foxp3*<sup>+</sup> (Malek and Bayer, 2004). En el timo, el desarrollo de Treg es obstaculizado por la deficiencia de IL-2 especialmente cuando es combinada con la deficiencia de otras citocinas como lo son IL-7 e IL-15. IL-2 es requerida para la expresión de *Foxp3* y CD25 en células Tregs naturales y potencia sus funciones supresivas *in vitro*. El desarrollo de Treg y mantenimiento son altamente dependientes de la secreción de IL-2 por otro subgrupo de linfocitos, mientras que las células Treg por si misma suprime la producción de IL-2.



Los análisis de citometría de flujo revelan que las células de melanoma murino B16F10 expresan el receptor de IL-2 subunidad alfa y se ha visto que en ensayos *in vitro* al administrar IL-2 recombinante se incrementa su proliferación celular sugiriendo un papel de esta citocina en la actividad tumoral de estas células (García de Galdeano *et al.*, 1996, p. 10).



**Figura 6. Papel de interleucina 2 en programación de células T reguladoras, inflamatorias**  
(Ruth Y. Lan, Carlos Selmi, M. Eric Gershwin\**Journal*).



## 4.9 TGF- $\beta$

El factor de crecimiento transformante tipo beta (TGF- $\beta$ ) es miembro de una superfamilia de factores polipeptídicos que inhiben el crecimiento e inducen apoptosis en un gran número de tipos celulares, particularmente células epiteliales.

La expresión de TGF- $\beta$  es regulada a nivel molecular por factores como NFAT, Smad y STAT. Sin embargo, la vía TGF- $\beta$ /Smad es considerada la más importante. TGF- $\beta$  es un miembro de la familia de polipéptidos diméricos de factores de crecimiento que funcionan a través de vías dependientes de Smad (Zhang et al., 2012). En estadios iniciales de tumorigénesis, un gran número de células pierde su respuesta al TGF- $\beta$  en términos de inhibición del crecimiento y/o activación de apoptosis (Seoane, 2006). Por consiguiente, el TGF- $\beta$ , sus receptores y las moléculas transductoras son supresores de tumores. Sin embargo, se ha sugerido que la mayoría de los tumores humanos se vuelven refractarios a los efectos inhibidores del crecimiento inducidos por TGF- $\beta$  debido a des-regulación de otras vías de señalización, por ejemplo, la ruta de Ras/MAPK/ERKs. A modo de ejemplo, la sobreactivación de la vía de las ERKs confiere resistencia a los efectos pro-apoptóticos del TGF- $\beta$  en células de carcinoma hepatocelular humano, antagonizando su capacidad de inducir la expresión de una proteína esencial para el mecanismo de muerte celular (NOX4) (3). Además, en las células tumorales el TGF- $\beta$  puede también activar rutas mitogénicas y de supervivencia celular, tales como la ruta de Ras/MAPK y la PI3-K/Akt, bien directamente o mediante la transactivación de otros receptores como el del EGF o el del PDGF. Un desplazamiento a favor de las rutas pro-mitogénicas y de supervivencia sobre las de inhibición del crecimiento y apoptosis permite a las células escapar a los efectos supresores del TGF- $\beta$ , manteniendo la respuesta a esta citoquina en otros aspectos, tales como pérdida de expresión de moléculas de adhesión celular, lo que conduce a un aumento de su capacidad migratoria. Además, es conocido que el TGF- $\beta$  estimula angiogénesis (formación de vasos sanguíneos) y suprime el sistema inmune, procesos que contribuyen a la progresión tumoral. Un gran porcentaje de tumores humanos muestran sobre-expresión de TGF- $\beta$ 1, que suele asociarse a mal pronóstico.



Como se ha mencionado anteriormente, las Treg suprimen la proliferación de células T  $CD4^+CD25^-$ , producción de inmunoglobulinas de células B; sin embargo, esta supresión no es llevada a cabo en la presencia de anti-TGF $\beta$ . Células Treg estimuladas pero no células T  $CD4^+CD25^-$  expresan altos y persistentes niveles de TGF- $\beta$  1 sobre la superficie de las células, lo cual induce que las Treg inducen inmunosupresión vía interacción célula-célula involucrando TGF- $\beta$  1 en la superficie celular. Células supresoras derivadas de TGF- $\beta$  se unen a células activadas y pueden transducir señales supresivas dependientes de contacto a través de complejos heteroméricos que consisten de componentes del receptor tipo I (RI) y tipo II (R2). Se ha comprobado que TGF- $\beta$  induce la expresión de *Foxp3* en células T nativas  $CD4^+CD25^-$  de ratones transgénicos RAG-/- con deficiencia de células T *Foxp3*<sup>+</sup> (Chen and Wahl, 2003). La noción que se tiene de que la señalización de TGF- $\beta$  es requerida para la inducción de la expresión de células Treg *Foxp3*<sup>+</sup> es reforzada con el hecho de que las células T  $CD4^+CD25^-$  deficientes de la señalización de TGF- $\beta$  no son convertidas en células Treg *Foxp3*<sup>+</sup> in vitro e in vivo. Mediante el análisis de la expresión de *Foxp3* en ratones deficientes de *Smad3*, se ha demostrado que *Smad3* es esencial para la inducción de células *Foxp3*<sup>+</sup> mediada por TGF- $\beta$  in vitro (Takimoto *et al.*, 2010).

En la periferia, TGF- $\beta$  es capaz de inducir la expresión de *Foxp3* en células T  $CD4^+$  nativas en la presencia de IL-2. Sin embargo, en humanos, la expresión de *Foxp3* puede ser inducida posterior a la señalización de TCR en la ausencia de TGF- $\beta$  exógena (Lan *et al.*, 2007).

#### 4.10 IL-10

IL-10 es una polipéptido de 18 kDa que pierde la glicosilación detectable y es expresada como un homodímero no covalente. La señalización mediada a través del receptor de IL-10 usa la vía Jak/STAT. La unión de IL-10 a su receptor activa Jak1 y Tyk2 kinasa e induce a la activación de STAT1, STAT3 y en células no macrófagos, STAT5. IL-10 es secretada por múltiples células, incluyendo células T, monocitos, células B activadas y algunos tumores humanos (Rabinovich *et al.*, 2010).





La interleucina (IL-10) es una importante citocina inmunorreguladora que actúa en las células presentadoras de antígeno (células dendríticas, macrófagos y células T) mediante la inhibición tanto de la síntesis de citocinas como de moléculas co-estimuladoras y moléculas HLA clase II. Es considerada una citocina anti-inflamatoria. Durante la infección puede inhibir la actividad de las células Th1, NK y macrófagos los cuales son requeridos para la total eliminación de patógenos sin embargo, puede contribuir al daño del tejido. En consecuencia IL-10 puede impedir la eliminación total de patógenos y la resolución de la inmunopatología (Couper *et al.*, 2008). Asimismo, actúa directamente en la proliferación y diferenciación de las células T responsables de la respuesta inmune tipo Th2. Expresión de la interleucina (IL-10) con función inmunorreguladora en mucosa de pacientes con colitis ulcerosa crónica idiopática (Fonseca-Camarillo *et al.*, 2011).

La IL-10 puede favorecer el crecimiento del tumor por la estimulación de proliferación celular e inhibir la apoptosis celular, altos niveles de IL-10 son correlacionados con pobre sobrevivencia en algunos pacientes con cáncer; sin embargo no existe una correlación reportada. Existen estudios que reportan lo contrario (altos niveles de IL-10 mayor sobrevivencia) es observada cuando los niveles de citocinas son evaluados en las muestras de tumores.

La IL-10 es secretada por tumores (o células inmunes infiltrantes de tumor) para permitir a las células malignas a escapar de la inmunovigilancia. Por el contrario, otros ensayos preclínicos y modelos clínicos sugieren que IL-10 podría favorecer el rechazo del cáncer mediado por el sistema inmune. Recientes estudios han clarificado que la actividad inmunosupresiva de IL-10 sobre las células T es principalmente indirecta y es mediada por otros tipos de células inmunes; células dendríticas (DC) y células T reguladoras (Treg).

Las Treg contribuyen a la inducción de tolerancia periférica vía expresión de moléculas de superficie celular o la producción de citocinas inmunoreguladoras, tales como IL-10 y TGF- $\beta$ . La producción y acción de estas dos citocinas son



interrelacionadas en las cuales IL-10 puede potenciar la producción de TGF- $\beta$  y contribuir a la habilidad de células blanco a responder a TGF- $\beta$  (Mocellin *et al.*, 2005). Muchos estudios han demostrado niveles elevados de IL-10 en el suero de pacientes con estadios tardíos de melanoma. Esta citocina de tipo Th2 impide las funciones inmunes incluyendo la proliferación de células T, producción de citocinas Th1, presentación de antígenos y citotoxicidad celular. IL-10 es secretada por células de melanoma, incluyendo melanoma metastásico y ha sido reportado por reducir la inmunovigilancia en pacientes con melanoma avanzado. El mecanismo que conduce la sobreexpresión de IL-10 en células de melanoma no es totalmente entendido. La producción de IL-10 derivada de melanoma podría suprimir la diferenciación y función de células dendríticas y niveles de IL-10 son reportados en nódulos no centinelas en pacientes con melanoma primario residual o en nódulos centinelas de melanoma metastásico. La IL-10 producida por células de melanoma, actúan como un factor de crecimiento autócrino. La expresión del RNAm de IL-10 ha sido reportada de moderada a alta en células tumorales de melanoma de fase de crecimiento vertical y melanoma metastásico. Esto sugiere que la producción de IL-10 por células de melanoma podría estar relacionado con la capacidad de tumores primarios para proliferar, expandirse y evadir tejidos adyacentes y adquirir cierta competencia para inducir metástasis (Itakura *et al.*, 2011).

#### **4.11 INF- $\gamma$**

La señalización de INF- $\gamma$  induce diversas funciones biológicas principalmente relacionadas con la defensa del hospedero y regulación inmune, incluyendo defensa antiviral, antibacterial, ciclo celular, apoptosis, inflamación e inmunidad innata y adquirida (Schroder *et al.*, 2004).

La función más caracterizada de INF- $\gamma$  es la sobrerregulación de moléculas del MHC clase I involucradas en la presentación de antígenos. Regula la diferenciación y función de muchos tipos celulares, al igual que está directamente involucrado en los aspectos de las respuestas mediadas por células Th1 resultando en la diferenciación, activación,



homeostasis de las células T. Inhibe el desarrollo de células Th2 pero promueve el desarrollo de células Treg (Agnello *et al.*, 2003; Seliger *et al.*, 2008).

Activa macrófagos e induce la producción de citocinas, las cuales reclutan a las células efectoras a los sitios de inflamación. Al igual que se ha asociado con funciones citostáticas/citotóxicas antitumorales. Las primeras demostraciones de los efectos antiproliferativos del INF- $\gamma$  en melanoma fue reportado por Fisher y colaboradores. Subsecuentemente fue identificado como uno de los factores de crecimiento inhibitorios presente en el medio condicionado de células T activadas (Brown *et al.*, 1987).

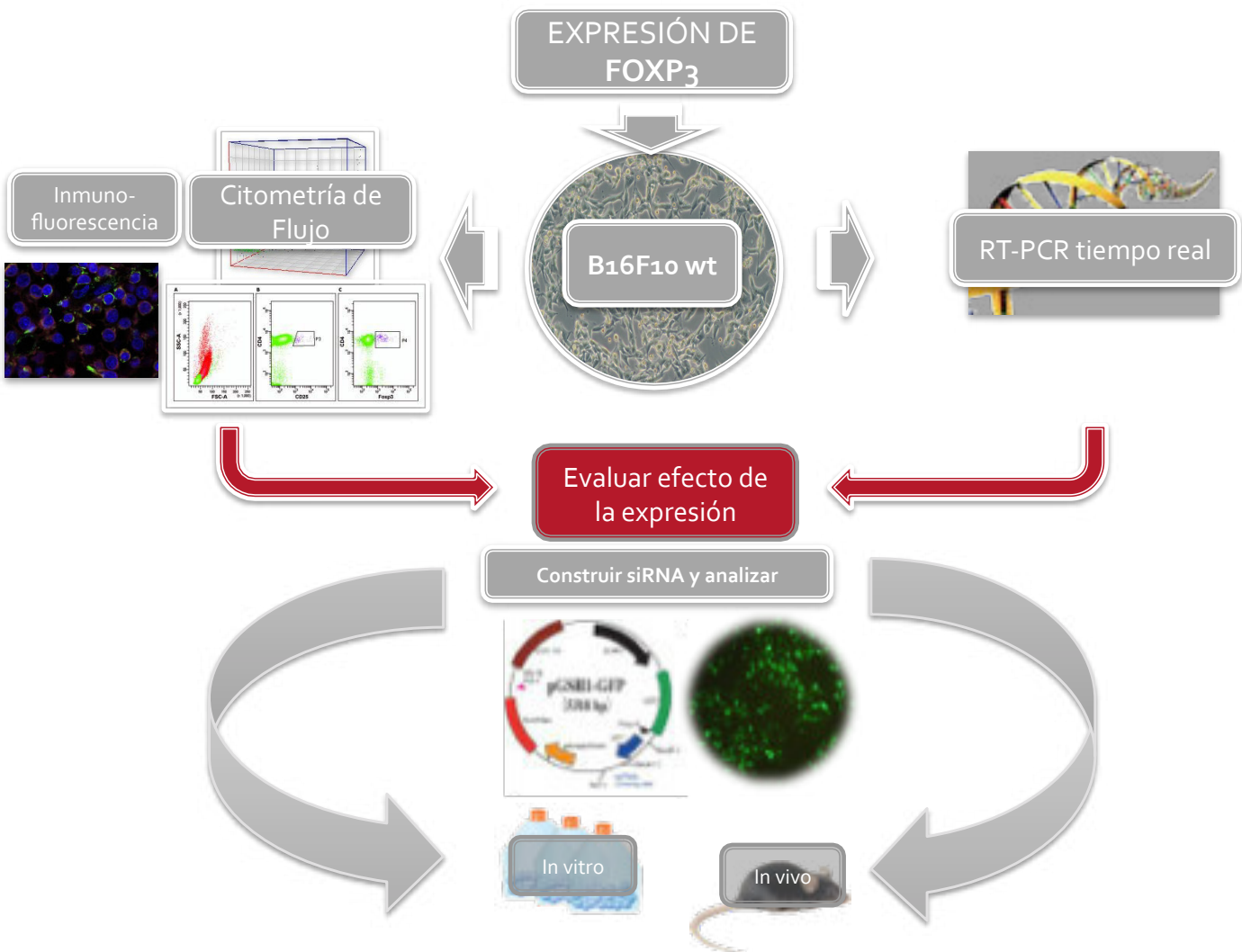
Kortylewski y colaboradores reportaron que INF-  $\gamma$  tuvo efecto inhibitorio en 4 diferentes células de melanoma y que la inhibición del crecimiento fue dependiente de la activación de STAT1 sin embargo se conoce actualmente que INF- $\gamma$  sobrerregula c-jun y c-myc en una manera independiente de Stat1 (Kortylewski *et al.*, 2004; Ramana *et al.*, 2001).

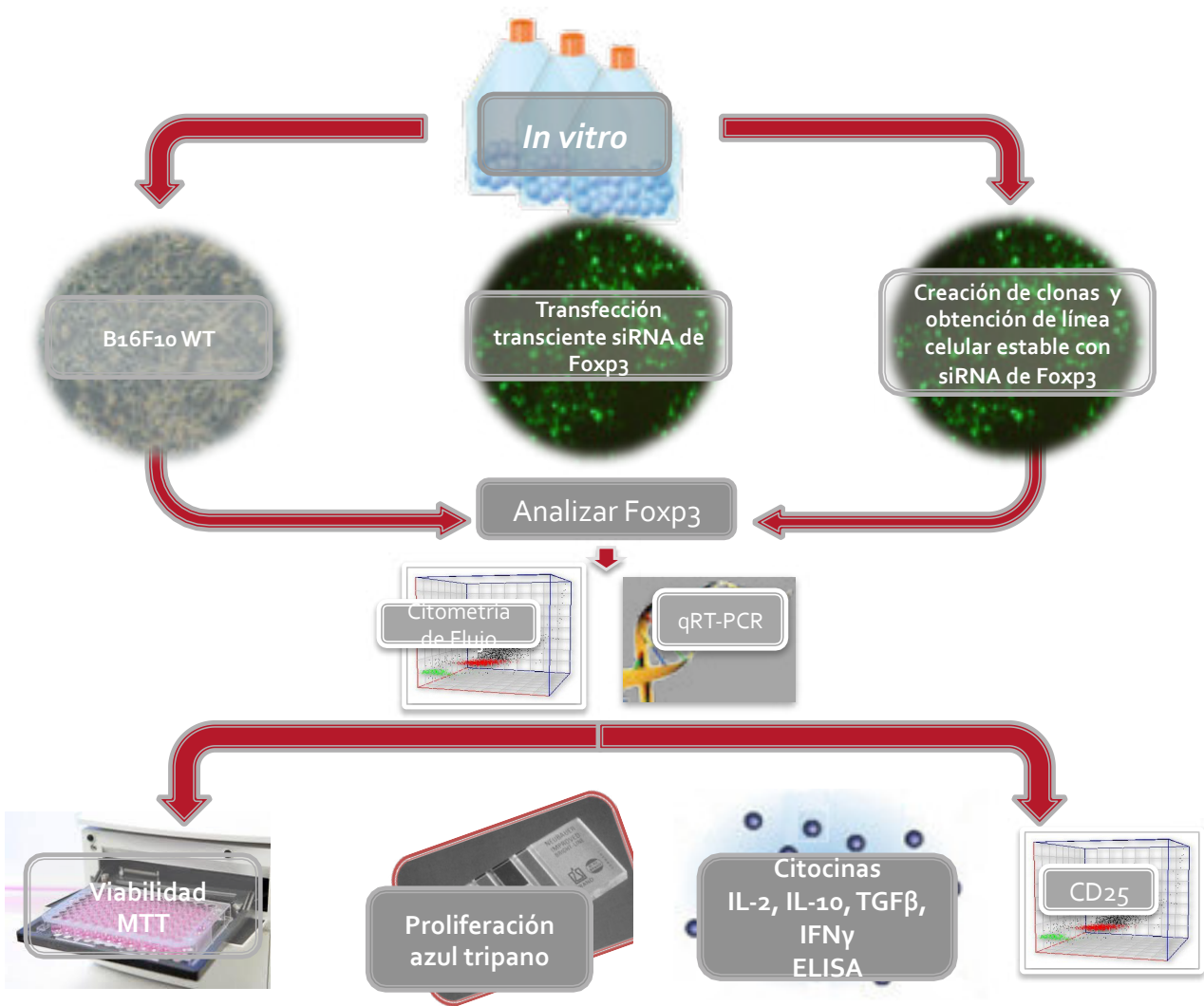
Shiller y colaboradores reportaron en estudios de pacientes en fase II y III a la administración de INF- $\gamma$  con un buen pronóstico sin embargo este estudio falló debido a la no eficacia del tratamiento con un rango de respuesta solo del 5% y con observación de efectos secundarios además de supresión de células T cooperadoras. Otros ensayos de melanoma con la administración como adyuvante de INF- $\gamma$  tuvieron que ser prematuramente terminados debido a que los pacientes tenían un peor pronóstico que los pacientes no tratados. Por lo que INF- $\gamma$  es considerado por tener 2 funciones ; puede ser citostático/citotóxico como puede tener efectos citoproliferativos dependiendo del contexto. Tanto INF- $\gamma$  como TGF- $\beta$  son ejemplos bien conocidos de factores secretados que desempeñan funciones duales en comportamientos diferentes (Schiller *et al.*, 1996).

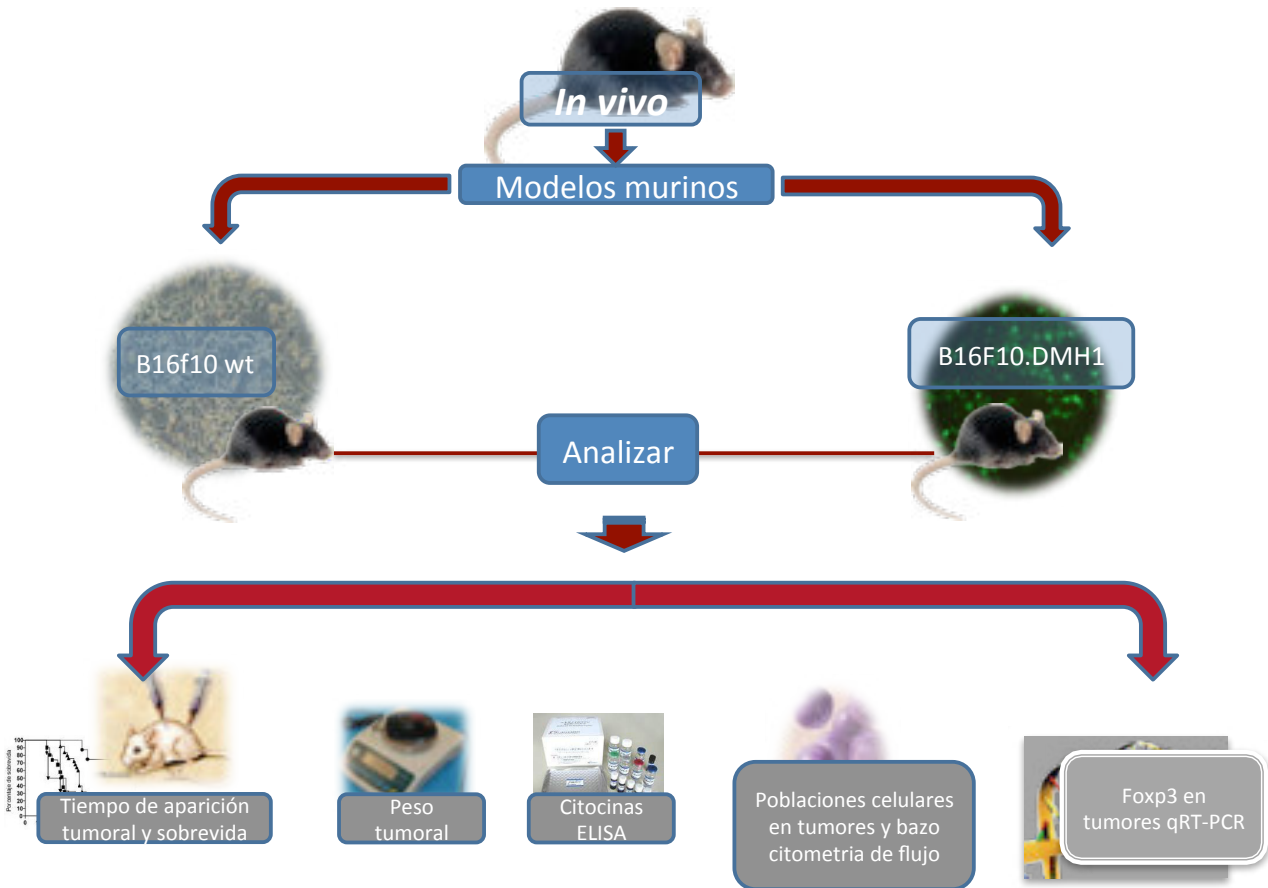
Por el paso de las últimas 3 décadas, INF- $\gamma$  ha establecido una reputación de ser un guardián inmunológico en contra de neoplasias. Schreiber y colaboradores han implicado a INF- $\gamma$  como parte fundamental en la immunoedición. Muchas líneas de evidencia colocan a INF- $\gamma$  en la fase de eliminación en el paradigma de la inmunedición tumoral, sin embargo recientes evidencias citan a INF- $\gamma$  estar involucrado en las fases de equilibrio y/o evasión, siendo fases más protumorigénicas (Dunn *et al.*, 2004). Como



bien se sabe el papel principal de INF-  $\gamma$  es potenciar la respuesta inflamatoria, y desempeña un papel principal en limitar la destrucción de tejido posterior al proceso inflamatorio. INF- $\gamma$  induce cascadas inflamatorias que activa a una gran variedad de células inmunes como macrófagos, NK, CTL's, los cuales juegan un papel principal en la reparación de tejido posterior a la inflamación. INF- $\gamma$  puede proteger a las células normales del daño colateral asociado con la remodelación y reparo de tejido, sin embargo, este mismo mecanismo puede permitir a las células desarrollar mutaciones para evadir la destrucción y permanecerlas en el estadio de equilibrio hasta que sean totalmente transformadas. La supresión de células CTL- y NK que median las respuestas inmunes es central para la fase de escape tumoral, y en gran cantidad de estudios se ha identificado que la participación de INF-  $\gamma$  puede estar íntimamente involucrada en estos mecanismos de inmunosupresión. Se ha observado que INF- $\gamma$  sobrerregula el desarrollo de Treg y suprime CTLs por la inducción de indoleamina 2,3-dioxygenasa (IDO) en células de melanoma (Mellor and Munn, 2008). INF-  $\gamma$  atenúa la infiltración de neutrófilos y células mieloides en el microambiente, lo cual constitutivamente activa la expresión de CIITA en melanoma, induciendo la sobrerregulación de antígenos MHC clase II, los cuales son asociados con progresión maligna y resistencia a Fas-L<sup>+</sup> (Herlyn *et al.*, 1985).









## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1 Línea celular**

La línea celular de melanoma murino B16F10 *wt* fue cultivada en una atmósfera a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en medio Dulbecco's modified Eagle's (DMEM/F-12) (Life Technologies, Invitrogen, Burlington, Ontario Canada) y 10% de suero fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY, USA).

### **5.2 Animales**

Ratones C57BL6 (de 5-6 semanas) fueron adquiridos de Harlan, México, S.A. de C.V. y mantenidos en un ambiente libre de patógenos. Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el comité de ética animal del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

### **5.3 Extracción de RNA**

Se tomaron cajas de cultivo celular con la línea de melanoma murino B16F10 que presenten un 80% de confluencia, las células B16F10 *wt* se disgregaron utilizando 2 mL de Tripsina(0.05%)-EDTA(0.5%), se incubaron durante 2 minutos, posteriormente se agregaron 2 mL de medio DMEM/F12 para la inactivación de la tripsina y las células fueron desprendidas y se colectaron en tubos eppendorf de 15 mL, se centrifugaron a 1600 rpm para la obtención de pellets celulares.

Las células se lisaron con 1 mL de trizol y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se adicionaron 200 µL de cloroformo y se agitaron vigorosamente por 15 segundos, se reposaron durante 2-3 minutos y se centrifugaron a





14,000 rpm por 20 minutos a 4°C, obteniendo 2 fases, una acuosa donde se obtuvo el RNA y otra fase orgánica. La fase acuosa se transfirió a un tubo eppendorf y se le añadieron 500 µL de isopropanol al 100%, se agitó mediante inversión y se incubó a temperatura ambiente por 10 min, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C para la obtención de pellet. El “pellet” de RNA formado se lavó mediante agitación por vórtex durante 15 segundos en 1 mL de etanol al 75%, finalmente se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos a 4°C y se desechó el sobrenadante. Se dejó secar el etanol restante del “pellet” y se resuspendió en 20 µL de agua DEPC (dietilpirocarbonato) seguido de una incubación de 65°C por 15 minutos para su completa disgregación, finalmente se determinó su concentración a 260 nm.

Los RNA extraídos de las células se almacenaron a -70° C hasta su uso.

#### **5.4 Obtención de cDNA**

Se adicionó en un tubo eppendorf un volumen correspondiente a 5 µg de RNA, 1µL de oligo dT 0.5 mg/µL de una mezcla de dNTP 10 mM y se llevó a un volumen de 12 µL con agua DEPC, se calentó a 65°C por 5 min, se adicionaron 4 µL de Buffer First Strand 5X, 2 µL de DTT 0.1M y 1 µL de Inhibidor de Ribonucleasa, posteriormente se mezclaron e incubaron las muestras a 42°C por 2 minutos, se adicionó 1 µL de Superscript RT una unidad por microlitro a cada muestra, se incubaron a 42°C por 50 minutos y se inactivaron las reacciones calentando a 70°C por 15 minutos. El cDNA se almacenó hasta su uso a -70°C.



## 5.5 Expresión de Foxp3

Para determinar si la línea celular de melanoma murino B16F10 *wt* expresaba Foxp3, se realizó el análisis de la expresión del RNAm de Foxp3 mediante PCR tiempo real (qRT-PCR). Para la detección de Foxp3 se utilizó el termociclador automatizado PTC-200 (MJ Research, Watertown-Mass., USA), el kit SYBR Supermix (Invitrogen, Paisley, UK), el primer set para Foxp3 RT<sup>2</sup>PCR Primer Set (SuperArray Biosciences, USA) y  $\beta$ -actina como gen endógeno de referencia. Las condiciones en el termociclador para la detección de Foxp3 fueron 10 min a 95° C para el calentamiento inicial, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95° C, alineación a 60° C y extensión a 72° C durante 15 segundos. Las condiciones del termociclador para la detección de  $\beta$ -actina fueron 10 min a 95° C para el calentamiento inicial, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95° C por 15 seg y alineamiento/extensión a 60° C por 60 seg. La expresión relativa fue determinada utilizando el Software Rotor Gene. Para la amplificación de  $\beta$ -actina, 20  $\mu$ M de los siguientes primers fueron utilizados: forward 5' GGCATCGTGATGGACTCCG 3' y reverse 5' GCTGGAAGGTGGACAGCGA 3' y el primer set para la detección de Foxp3 (SuperArray Biosciences, USA) fue utilizado en un volumen total de reacción de 25  $\mu$ L.

## 5.6 Detección de Foxp3 mediante microscopia confocal

Las células de melanoma murino B16F10 *wt* fueron tratadas con la solución de permeabilizado (eBioscience, USA) durante 30 min a 4° C en la oscuridad. Posteriormente las células fueron centrifugadas a 1600 rpm por 10 min y resuspendidas en 100  $\mu$ L de buffer de permeabilización conteniendo el anticuerpo anti-ratón Foxp3 (FITC, eBioscience, USA) e incubadas por 30 min a 4° C y en oscuridad, se realizó un lavado a 1600 rpm por 10 min a 4° C y posterior a la centrifugación el sobrenadante fue removido y las células fueron resuspendidas en 20  $\mu$ L de paraformaldehído y montadas sobre un cubreobjeto utilizando Vectashield con DAPI (Vector laboratories) como medio de montaje e inmediatamente fueron visualizadas mediante microscopia confocal.



## 5.7 Análisis de citometria de flujo para la determinación de CD25 y Foxp3

Para analizar los niveles de expresión de CD25 y Foxp3,  $1 \times 10^6$  células de melanoma murino B16F10 obtenidas de cultivo y de tumores fueron teñidas usando el anticuerpo anti-ratón CD25 (eBioscience, USA) en un volumen final de 100  $\mu$ L del buffer de tinción (flow cytometry staining buffer) y fueron incubadas a 4° C durante 30 min, las células fueron lavadas a 1600 rpm durante 10 min a 4° C en buffer de tinción frío, se descartó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en vortex, posteriormente se agregó a las células 1 mL de la solución de trabajo Fijación/permeabilización las cuales fueron incubadas a 4° C durante 30 min, lavadas dos veces con 2 mL del buffer de permeabilización 1X a 1600 rpm durante 10 min a 4° C y el sobrenadante fue removido. Se agregó el anticuerpo anti-ratón Foxp3 (FJK-16s) (eBioscience, USA) en un volumen final de 100  $\mu$ L del buffer de permeabilización 1X y se incubó durante 30 min a 4° C en oscuridad. Posteriormente, las células fueron lavadas una vez más con 2 mL de buffer de permeabilizado 1X a 1600 rpm por 10 min a 4° C, se descartó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 1% de paraformaldehído. Los datos fueron analizados utilizando el citómetro de flujo (Epics Altra, Beckman Coulter, Fullerton CA, USA).

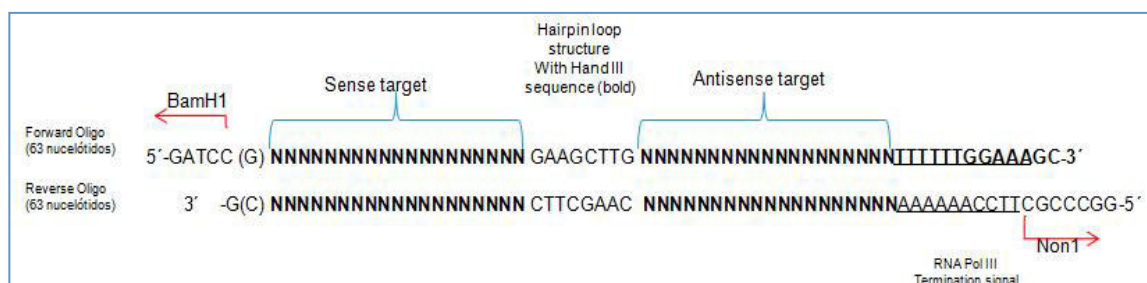
## 5.8 Diseño y construcción de plásmidos que codifican para silenciar el gen Foxp3, sus características se encuentran en la siguiente tabla.

Secuencia	Posición	Contenido CG	SiRNA sentido	SiRNA antisentido
AATGAAATCTA CCATTGGTTT	1081	28.6%	UGAAAUCUAC CAUUGGUUUtt	AAACCAAUGGUAG AUUUCAtt
AACATGGACTA CTTCAAGTAC	979	38.1%	CAUGGACUAC UUCAAGUACtt	GUACUUGAAGUA GUCCAUGtt
AATGAAATCTA CCATTGGTTT	1081	28.6%	UGAAAUCUAC CAUUGGUUUtt	AAACCAAUGGUAG AUUUCAtt
AAATCTACCAT TGGTTTACTC	1085	33.3%	AUCUACCAUU GGUUUACUCtt	GAGUAAACCAAUG GUAGAUtt
AATTTGAGTTTC GCAAGAAGA	1229	33.3%	UUUGAGUUUC GCAAGAAGAtt	UCUUCUUGCGAAA CUCAAAAtt

**Tabla 2. Características de las secuencias blanco para FOXP3.**



En base a estas secuencias se diseñaron dos pares de oligos (sentido y antisentido) utilizando el software (Ambion, Austin, TX, USA) para posteriormente ser clonados en el vector PGSH1-GFP, y generar dos RNAi contra de FOXP3. EL diseño se hizo siguiendo el siguiente prototipo:



**Figura 7. Prototipo para el diseño de oligos sentidos y antisentidos para su expresión en el plásmido PGSH1-GFP.**

## 5.9 Alineamiento

Los oligos se disolvieron con agua inyectable para obtener una concentración de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y se alinearon tomando 2  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleótido (sentido y antisentido) en 46  $\mu\text{L}$  de buffer de alineación (100 mM de acetato de potasio, 30mM HEPES-KOH pH 7.4 y 2mM de acetato de  $\text{Mg}^{++}$ ), se incubaron las mezclas a 90°C por 3 min y después a 37°C por 1 hr. Se adicionaron 350  $\mu\text{L}$  de agua grado PCR a la mezcla de reacción de alineación para obtener un volumen final de 400  $\mu\text{L}$  y una concentración de trabajo de 10 ng/ $\mu\text{L}$ .

## 5.10 Ligación de los oligos alineados en el vector de expresión lineal siRNA

Se llevaron a cabo para cada secuencia la reacción de ligación con 1  $\mu\text{L}$  del vector de expresión siRNA (50 ng/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de los oligos alineados (10 ng/ $\mu\text{L}$ ), 5  $\mu\text{L}$  del buffer de ligación 2X, 1  $\mu\text{L}$  de la enzima T4 ligasa y 2  $\mu\text{L}$  de agua para un volumen final de reacción total de 10  $\mu\text{L}$ . Las reacciones se incubaron a 4°C toda la noche. Las reacciones de ligación fueron almacenadas a -20° C hasta su uso.



Las características del vector se muestran a continuación:

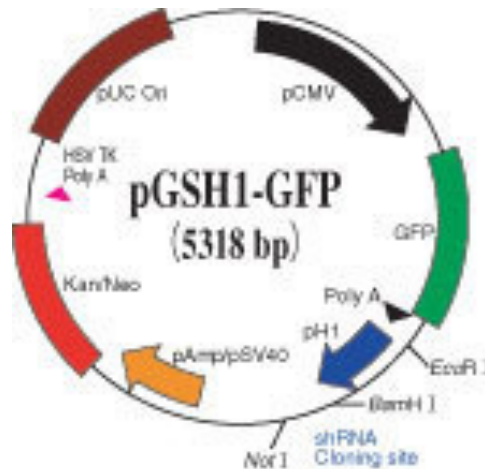


Figura 8. Mapa del plásmido *pGSH1-GFP*

Element	Start-End	Description
pCMV	59-808	human CMV promoter sequence
GFP	843-1500	Green Fluorescent Protein gene sequence
Poly A	1572-1801	Transcription stop and polyadenylation sequence
pH1 promoter	1808-1900	H1 RNA Polymerase III promoter
pAmp/pSV40	2689-3030	Ampicillin and SV40 promoters (in tandem)
Kan/Neo	3152-3942	Kanamycin and Neomycin resistance gene sequence
HSV TK Poly A	4182-4200	HSV Thymidine Kinase polyadenylation signal sequence.
pUC Ori	4531-5174	pUC origin of replication sequence.

Tabla 3. Elementos del vector *pGSH1-GFP*

MCS sequence of linearized *pGSH1-GFP* (spanning nucleotides 1931-2016)

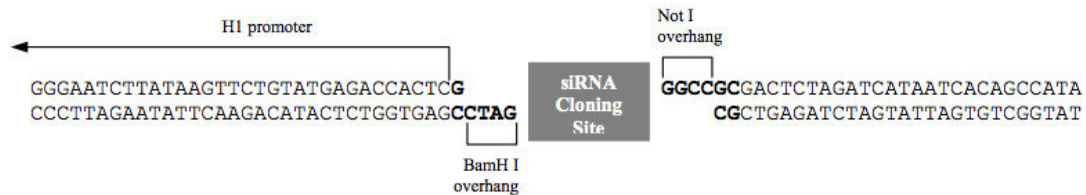


Figura 9. Secuencia linealizada de *pGSH1-GFP*



### **5.11 Transformación**

Se transformaron 70  $\mu$ L de bacterias E.coli DH5 $\alpha$  competente con 5  $\mu$ L del producto de ligación y se sembraron las bacterias en cajas petri con agar LB con 50  $\mu$ g/mL de kanamicina y se crecieron toda la noche a 37°C. Se tomaron de 3 a 4 colonias transformadas y se sembraron en medio LB con 50  $\mu$ g/mL de kanamicina, se crecieron toda la noche a 37°C y posteriormente se realizó una extracción de plásmidos a pequeña escala.

### **5.12 Verificación del plásmido recombinante**

Se realizaron reacciones de digestión para verificar el DNA plasmídico positivo con 1-17  $\mu$ L del miniprep de DNA plasmídico (100-200 ng ), 1  $\mu$ L de la enzima Hind III, 2  $\mu$ L del buffer de restricción 10 X y de 0-16  $\mu$ L de agua grado PCR, para obtener un volumen final de 20  $\mu$ L.

Se incubaron las reacciones a 37°C por 2 horas y los productos se corrieron en un gel de agarosa al 1% para su verificación.

Nota: Las clonas positivas conteniendo los RNAi tienen un único sitio de corte por Hind III en el centro de la estructura del loop, así que la digestión producirá un plásmido lineal. Las clonas negativas serán similares al plásmido control súper enrollado después de la digestión.

### **5.13 Extracción de plásmidos a mediana y grande escala**

Para obtener cantidades suficientes de los plásmidos para las posteriores transfecciones en la línea celular de melanoma murino B16F10, se realizaron midipreps utilizando los kits comerciales de QIAGEN para la purificación de plásmidos.

Para la extracción a mediana escala, se pusieron a sembrar las bacterias transformadas en 25 mL y 2.5 L a 37° C toda la noche, posteriormente se centrifugó para obtener el



pellet al cual se le adicionó 4 mL del buffer P1 y se homogenizaron las bacterias, después se adicionaron 4 mL del buffer P2, se mezcló por inversión 4-6 veces y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente se adicionó 4 mL del buffer P3 se mezcló inmediatamente invirtiendo el tubo 4-6 veces y se incubó en hielo por 15 min. Se centrifugó a 20,000 g por 30 min a 4° C y se removió el sobrenadante conteniendo el plásmido. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 20,000 g por 15 min a 4° C. Se equilibró la columna (QIAprep Spin Miniprep Columns, USA). Se lavó la columna 2 veces con 10 mL de buffer QC (Quiagen plasmid Midi kit, USA) en cada lavado. Se eluyó el ADN con 5 mL de buffer QF (Quiagen plasmid Midi kit, USA) y se precipitó agregando 3.5 mL (0.7 volúmenes) de isopropanol. Se mezcló y se centrifugó a 15,000 g por 30 min a 4° C y con cuidado se decantó el sobrenadante. Se lavó el pellet con 2 mL de etanol al 70% y se centrifugó a 15,000 g por 10 min., se decantó el sobrenadante y se dejó secar el pellet para posteriormente disolverlo en buffer TE pH 8.0.

#### **5.14 Preparación del polímero catiónico polietilenamina (PEI) de 25 kDa para los ensayos de transfección**

Se utilizó el polímero catiónico polietilenamina 25 kDa (PEI) ramificada (Sigma, Aldrich, Milwaukee, IL USA) para los ensayos de transfección tanto *in vitro* como *in vivo*. Se preparó un stock a una concentración de 4.3 mg/mL en H<sub>2</sub>O, pesando 430 mg en 50 mL de H<sub>2</sub>O para obtener una concentración de trabajo de 150 mM. El ADN posee por microgramo 3 nMol de fosfato y 1 µL de una solución de PEI 0.1 M tiene 100 nMol de nitrógeno tipo amino. El ratio de carga resultante es expresado como nitrógeno de PEI: fosfatos de DNA= N:P. El N/P utilizado para la transfección *in vitro* fue N/P 5.

#### **5.15 Preparación de los complejos para los ensayos de transfección *in vitro***

Para conocer la cantidad de polietilenamina que se utilizó en las transfecciones se utilizó la siguiente fórmula.



$$\mu\text{L de PEI} = \frac{(\mu\text{g de DNA} \times 3) \times \text{radio N/P}}{150 \text{ mM}}$$

Las células de B16F10 wt ( $5 \times 10^3$  células/200  $\mu\text{L}$  de DMEM/F12 con 10% SFB) fueron cultivadas en cajas de 96 pozos y se realizó la transfección con 0.6  $\mu\text{g}$  de cada plásmido, para ello se diluyó 0.6  $\mu\text{g}$  de DNA en 10  $\mu\text{L}$  de NaCl 150 mM, se dio vortex, posteriormente se agregó el PEI diluido a la solución de DNA diluida y se dio vortex. Los complejos fueron posteriormente incubados durante 15-30 min a temperatura ambiente y se agregaron los complejos PEI/DNA a cada pozo.

### **5.16 Ensayo de viabilidad con MTT**

Para determinar los efectos de los plásmidos en las células B16F10 transfectadas, se realizó el ensayo de citotoxicidad mediante la técnica de MTT. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa en un compuesto coloreado azul (formazán), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Las células B16F10 wt fueron transfectadas con 0.6  $\mu\text{g}$  de los plásmidos siFoxp3-1, siFoxp3-2, siFoxp3-3, o con 0.3  $\mu\text{g}$  del plásmido pEGFP-N2 como control (CLONTECH, Palo Alto, CA, USA) siguiendo la metodología anteriormente descrita. Posterior a 72 h de la transfección se realizó el ensayo de MTT, para ello se pesaron 0.025 g de MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (Sigma, Aldrich, St. Louis, MO USA) y fueron disueltos en 5 mL de PBS para obtener una solución de trabajo con una concentración de 5  $\mu\text{g/mL}$ , posteriormente se adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de esta solución a cada pozo y la placa fue incubada en una atmósfera de 37° C y 5% CO<sub>2</sub>, posterior a 1 h de incubación se removió el medio y se agregaron 80  $\mu\text{L}$  de DMSO por pozo y se incubó en agitación durante 10 min a temperatura ambiente. La densidad óptica (DO) se determinó a 570 nm en un lector de microplacas (Microplate Autoreader EL311, BIOTEK Instruments Inc. Winooski, VA, USA). Con los resultados obtenidos





se determinó el porcentaje de viabilidad celular y mediante la visualización con el microscopio confocal (TE-Eclipse 300, Nikon Tokyo Japan) se determinó la eficiencia de transfección.

### **5.17 Selección de líneas celulares estables con silenciamiento de Foxp3**

El vector de expresión siRNA contiene el gen de resistencia a neomicina para la selección de líneas celulares. Neomicina (G418) es un aminoglucósido que bloquea la síntesis de proteínas en células de mamíferos interfiriendo la función ribosomal. La expresión del gen aminoglucósido fosfotransferasa (APH) en células de mamíferos resulta en la detoxificación de neomicina (G418).

### **5.18 Determinación de la sensibilidad de G418**

Para la generación de líneas celulares estables expresando el siRNA para Foxp3 después de la clonación del vector de expresión siRNA, se determinó la concentración mínima de G418 requerida para matar las células que no fueron transfectadas, para ello se probaron diferentes concentraciones de G418 en las células B16F10 *wt* y se siguió el siguiente protocolo. Se sembraron las células B16F10 *wt* ( $2.5 \times 10^3$  células/ 200  $\mu$ L DMEM/F suplementado con 10% SFB 12) en una placa de 96 pozos y se incubaron durante 24 h en una atmósfera de 37°C y 5 % CO<sub>2</sub>, posteriormente, se sustituyó el medio de cultivo por medio conteniendo diferentes concentraciones de G418 (0, 50, 100, 200, 400, 600 y 800  $\mu$ g/mL) y después 72 h se determinó la DL<sub>100</sub> mediante MTT, posteriormente se sembraron las células B16F10 *wt* en placas de 6 pozos con las condiciones anteriormente mencionadas, posterior a 24 h se realizó cambio de medio DMEM/F12 conteniendo 400  $\mu$ g/mL de G418 realizándose cambio de medio cada 3-4 días y observando que se previniera el crecimiento de células dentro de las siguientes 3 semanas después de la adición de G418.



### **5.19 Generación de línea celular B16F10 con silenciamiento de Foxp3 (B16F10.DMH1)**

Una vez ya determinada que la concentración de G418 elegida no causa resistencia en las células B16F10 *wt* y se previene el crecimiento celular, este se usó para la selección de la línea celular estable con silenciamiento de Foxp3 (siFoxp3). Posteriormente se transfectó las células B16F10 *wt* con la construcción de expresión linearizada de siFoxp3. Se incluyó una placa de células no transfectadas como un control negativo. Posterior a 24 horas de transfección, las células fueron lavadas y se agregó el medio nuevo, después de 48 h post-transfección, las células fueron tripsinizadas y sembradas con una confluencia no mayor al 25% y mantenidas en medio conteniendo la concentración pre-determinada de G418. Se realizó cambio de medio cada 3-4 días hasta que clonas de células G418-resistentes fueran identificadas. Posteriormente las clonas fueron expandidas en placas de 96 pozos. La identificación de clonas fueron visualizadas en el microscopio confocal durante el proceso de selección ya que estas clonas contienen el gen reportero verde fluorescente. Posteriormente se realizó el análisis de expresión de Foxp3 mediante la técnica de qRT-PCR y citometría de flujo en la línea celular con silenciamiento de Foxp3 la cuál fue identificada como B16F10.DMH1. También fue realizado el análisis de expresión de CD25<sup>+</sup> por citometría de flujo. Estos análisis fueron realizados siguiendo los protocolos ya anteriormente descritos para la línea celular B16F10 *wt*.

### **5.20 Análisis de proliferación celular de las líneas B16F10 *wt* y B16F10.DMH1**

Para el análisis de proliferación celular, se ajustaron las células B16F10 *wt* y B16F10.DMH1 a una concentración de  $2.5 \times 10^5$  células y fueron cultivadas en placas de 6 pozos con un atmósfera de 37° C y 5% CO<sub>2</sub>. Las células fueron despegadas usando tripsina al 0.25%, posteriormente fue inactivada la tripsina usando medio DMEM/F12 y se realizó una dilución 1:10 con una solución de azul de tripán para cuantificar las células viables a través de microscopio y determinar el porcentaje de viabilidad posterior a las 24, 48 y 72 h de incubación.



### **5.21 Diseño experimental *in vivo***

Grupos de ratones C57BL6 de 6 semanas de edad fueron inoculados subcutáneamente ( $5 \times 10^5$  células/ 200  $\mu$ l PBS) con las células B16F10 *wt* y B16F10.DMH1 respectivamente en el flanco derecho de los ratones previamente rasurados, posteriormente fueron monitoreados hasta determinar el tiempo de aparición de tumor y sobrevida de los ratones. Grupos de ratones (6 por grupo), inoculados con las células B16F10 *wt* fueron sacrificados a los días 7, 14 y 21 días post-aparición del tumor y los ratones inoculados con las células B16F10.DMH1 fueron sacrificados a los días 7, 14, 21 y 28 post-aparición del tumor (Debido a que la inhibición de Foxp3 incrementa la vida de los ratones). Los tumores y bazos fueron removidos y pesados bajo condiciones de asepsia. El análisis de expresión Foxp3, citocinas (IL-2, INF- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-10), poblaciones celulares CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> y la expresión de CD25<sup>+</sup> fueron evaluados mediante qRT-PCR, Elisa y citometría de flujo respectivamente.

### **5.22 Análisis de expresión del RNAm de Foxp3 en los tumores de melanoma murino inducido con células B16F10 *wt* y B16F10.DMH1**

Los tumores de los ratones fueron colectados como se describe anteriormente para los ratones inoculados con las células de melanoma murino B16F10 *wt* y B16F10.DMH1, posteriormente se maceraron los tumores en un mortero con nitrógeno líquido y se aisló el RNA utilizando trizol a partir de este se elaboró el cDNA de cada una de las muestras a partir de 5  $\mu$ g de RNA. La determinación de Foxp3 se realizó mediante RT-PCR tiempo real previamente descrito.



### **5.23 Aislamiento de TIL, células B16F10 *wt* y B16F10.DMH1 intratumorales**

Para la obtención de células de melanoma intratumorales (B16F10 *wt* y B16F10.DMH) y TIL's de tumores, los tejidos tumorales fueron sometidos a perfusión con DMEM/F12 usando una jeringa estéril y las células obtenidas fueron centrifugadas a 1600 rpm durante 10 min, posteriormente el sobrenadante fue eliminado y se agregaron 15 mL del buffer de potasio cloruro de amonio ACK: (0.15 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 0.1 mM  $\text{KHCO}_3$ ; 0.1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , pH 7.2) para la remoción de eritrocitos, las células fueron nuevamente centrifugadas a 1600 rpm durante 5 min. Para la obtención de células T de los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) y células intratumorales de melanoma (B16F10 *wt* y B16F10.DMH1 respectivamente) fue usado el kit de Dynabeads Flow Comp Mouse Pan T (CD90.2) (Invitrogen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. A una concentración de  $1 \times 10^8$  células se adicionó 1 mL del buffer de aislamiento provisto por el kit. El anticuerpo Flow Comp<sup>TM</sup> de ratón CD90.2 fue adicionado a la suspensión celular a una proporción de 25  $\mu\text{L}$  de anticuerpos por 500  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular ( $5 \times 10^7$  células), fue mezclado e incubado durante 10 min a 2-8° C. Posterior a la incubación, las células fueron lavadas agregando 2 mL del buffer de aislamiento, centrifugándose a 1600 rpm durante 8 min y resuspendidas en 1 mL del buffer de aislamiento. Las Dynabeads TM Flow Comp fueron resuspendidas y adicionadas al tubo conteniendo las células, fueron mezclados e incubados por 15 min a temperatura ambiente con agitación. Los tubos fueron colocados en el magneto por 1 min. Los sobrenadantes conteniendo las células tumorales fueron cuidadosamente colectados mientras el tubo permanecía en el magneto. Se repitió una vez mas el paso del lavado y los sobrenadantes fueron colectados nuevamente. Finalmente los sobrenadantes conteniendo las células tumorales fueron cultivados en una caja de cultivo de 75  $\text{cm}^2$  e incubados en una atmósfera a 37°C y 5%  $\text{CO}_2$  durante 3 h. Una vez que las células de melanoma fueron adheridas a la caja de cultivo, fueron lavadas con PBS para remover los restos celulares celulares. Para la liberación de las células T de las dynabeads, el tubo fue removido del magneto y los pellets celulares fueron cuidadosamente resuspendidos con 1 mL del buffer de liberación Flow Comp TM respectivamente e incubados por 10 min a temperatura ambiente en agitación. Los tubos fueron colocados en el magneto por



1 min, y los sobrenadantes conteniendo las células libres de perlas (linfocitos T) fueron transferidas a un tubo nuevo. Las células fueron lavadas una vez más con 2 mL del buffer de aislamiento, centrifugadas a 1200 rpm por 8 min y posteriormente fueron resuspendidas en medio DMEM/F12 con 10% SFB. La concentración de células de melanoma y células T provenientes de los TIL's fueron ajustadas a una concentración de  $1 \times 10^6$  células en un volumen final de 100  $\mu$ L del buffer de tinción de citometría de flujo Flow Cytometry Staining Buffer (eBioscience, USA). Posteriormente fue analizada la expresión de Foxp3 y CD25<sup>+</sup> para la expresión y análisis de poblaciones celulares CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3 las células fueron analizadas por citometría de flujo como es mencionado a continuación.

#### **5.24 Aislamiento de células T de bazo**

Para la obtención de células T derivadas de bazo, los bazos fueron lavados con DMEM/F12 usando una jeringa estéril. Después de los lavados, se agregó 5 mL del buffer de lisis de potasio cloruro de amonio (ACK lysis buffer: 0.15 M NH<sub>4</sub>Cl; 0.1 mM KHCO<sub>3</sub>; 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7.2) fue adicionado a las células colectadas para remover los eritrocitos, y las células fueron centrifugadas a 1600 rpm durante 10 min. Para la obtención de las células T provenientes de bazo fue usado el kit Dynabeads Flow Comp Mouse Pan T (CD90.2) (Invitrogen, USA) como es descrito anteriormente.

#### **5.25 Medición de producción de citocinas**

Las células de melanoma murino B16F10 *wt* y B16F10.DMH1 ( $5 \times 10^5$  células/1 mL DMEM/F12 suplementado con 10% SFB) fueron cultivados por 48 h en una atmósfera de 37° C y 5% CO<sub>2</sub>, y los sobrenadantes fueron colectados y almacenados a -20° C para el subsecuente análisis de producción de citocinas mediante ELISA (IFN- $\gamma$ , IL-2, TGF- $\beta$  e IL-10, Invitrogen, USA). Los tumores provenientes de ratones inoculados con las células B16F10 *wt* y B16F10.DMH1 fueron asépticamente colectados (a los días 7, 14 y 21, y 7, 14, 21 y 28 días respectivamente) y por cada 200 mg de tumor fueron



adicionados 500  $\mu$ L de PBS para posteriormente macerar los tumores y centrifugarlos a 1200 rpm por 10 min, para colectar el sobrenadante los cuales fueron almacenados a -20° C hasta su uso. Se realizó análisis de cuantificación de proteínas por la técnica de lowry y las proteínas fueron ajustadas a 1 mg antes del análisis de citocinas, posteriormente se realizó el análisis de citocinas mediante ELISA siguiendo las especificaciones del fabricante para cada citocina. Las absorbancias fueron leídas a 450 nm utilizando un lector de placas (EL311 Bio-tek instruments).

## **5.26 Cuantificación de proteínas**

Se realizó cuantificación de proteínas a los sobrenadantes colectados de los tumores como se menciona anteriormente, se utilizó el kit DC Protein Assay (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) para la cual se mezclaron 19 partes del reactivo A con una parte del reactivo S para cada una de las muestras y se agregaron los 20  $\mu$ L a cada uno de los pozos de una caja de 96 pozos y posteriormente se agregaron 5  $\mu$ L de las proteínas en una dilución 1:5, finalmente se agregaron a cada pozo 175  $\mu$ L del reactivo B, se incubó la placa 10 min a temperatura ambiente y se analizó a 595 nm en un lector de Elisa (EL311 Bio-tek instruments).

## **5.27 Análisis de poblaciones celulares CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3 en linfocitos T provenientes de TIL y bazo durante el desarrollo de melanoma murino inducido con células B16F10 wt y B16F10.DMH1**

Se realizó el análisis de poblaciones celulares por citometría de flujo de las células T provenientes de linfocitos infiltrantes de tumor TIL y células de bazo que fueron obtenidas como fue descrito anteriormente. Para el análisis se utilizó el kit Mouse Regulatory T Cell Staining kit #3 (eBioscience, San Diego, CA, USA), el cuál incluye isotiocinato de fluoresceína (FITC) para la detección de CD4<sup>+</sup>, ficoeritrina (PE) para la detección de CD25<sup>+</sup> y ficoeritrin-cianina Cy5 (PE-Cy5) para la detección de Foxp3. Se



siguió el siguiente protocolo; se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de las células preparadas (aproximadamente  $1 \times 10^6$  células) a cada tubo, se tiñeron las moléculas de superficie utilizando 0.125  $\mu\text{g}$ /prueba del anticuerpo anti-ratón CD4 y 0.06  $\mu\text{g}$ /prueba del anticuerpo anti-ratón CD25<sup>+</sup> en un volumen final de 100  $\mu\text{L}$  del buffer de tinción (Flow Staining Buffer) y se incubó por 30 min a 4° C en oscuridad. Posteriormente las células fueron lavadas en buffer de tinción frío Flow Cytometry Staining Buffer provisto por el kit, se centrifugaron a 1600 rpm por 10 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante, las células fueron resuspendidas con vórtex y se agregó 1 mL de la solución de trabajo Fixation/Permeabilization working solution a cada muestra, se agitó mediante vórtex, fueron incubadas a 4°C por 30 min. Las células fueron lavadas una vez más con 2 mL del buffer de permeabilización 1X centrifugadas a 1600 rpm por 5 min a 4°C y se descartó el sobrenadante, se repitió nuevamente el paso de lavado. Se agregaron 0.5  $\mu\text{g}$  del anticuerpo anti ratón/rata Foxp3 (FJK-16s) en un volumen final de 100  $\mu\text{L}$  del buffer de permeabilización 1X y fueron incubadas a 4° C durante 30 min en oscuridad. Las células fueron lavadas con 2 mL del buffer de permeabilización 1X centrifugadas a 1600 rpm por 5 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante, se repitió nuevamente el paso anterior de lavado y finalmente fueron resuspendidas en 500  $\mu\text{L}$  del buffer de tinción de citometría de flujo Flow Cytometry Staining Buffer y analizadas por citometría de flujo. Como control para cada muestra las células fueron ajustadas y se realizaron los pasos descritos anteriormente, exceptuando la adición de los anticuerpos. Posterior al gate de linfocitos T provenientes de TIL's y bazo, las poblaciones celulares de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3 fueron subsecuentemente identificadas y analizadas. El porcentaje de células Foxp3<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3) fueron analizadas posterior al gate de la población CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Los datos fueron analizados usando el citómetro de flujo (Epics Altra, Beckman Coulter, Fullerton CA, USA).



### 5.28 Análisis de la expresión de CD25<sup>+</sup> en TIL's y células de bazo durante el desarrollo de melanoma murino inducido con células B16F10 wt y B16F10.DMH1

Para analizar los niveles de expresión celular de CD25<sup>+</sup> durante la evolución de melanoma murino  $1 \times 10^6$  linfocitos T infiltrantes de tumor y células T provenientes de bazo fueron teñidas usando el anticuerpo anti-ratón CD25 (PE eBioscience, USA) en un volumen final de 100  $\mu$ L del buffer de tinción Flow Cytometry Staining buffer provisto por el kit Mouse Regulatory T Cell Staining kit #3 (eBioscience, San Diego, CA, USA) y fueron incubadas a 4° C por 30 min en oscuridad. Las células teñidas fueron centrifugadas a 1600 rpm por 10 min a 4°C se descartó el sobrenadante y fueron resuspendidas en 1% del buffer de tinción Flow Cytometry Staining Buffer para su posterior análisis, los datos fueron analizados utilizando el citómetro de flujo (Epics Altra, Beckman Coulter, Fullerton CA, USA).

### 5.29 Evaluación de la sobrevivencia

Para evaluar la sobrevivencia en los ratones C57BL6 inoculados con las líneas celulares de melanoma murino B16F10 wt y B16F10.DMH1 se corrió un experimento paralelo con 10 ratones por grupo y se monitorearon hasta determinar su sobrevivencia.

### 5.30 Análisis Estadístico

Todos los experimentos tanto *in vitro* como *in vivo* fueron llevados a cabo por triplicado. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) y las pruebas de Tukey y Dunett para discernir si existía diferencia entre los análisis con las 2 líneas celulares de melanoma murino analizadas, tomándose valores de \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.001$  como significativos. Se realizaron análisis de correlación de Pearson.



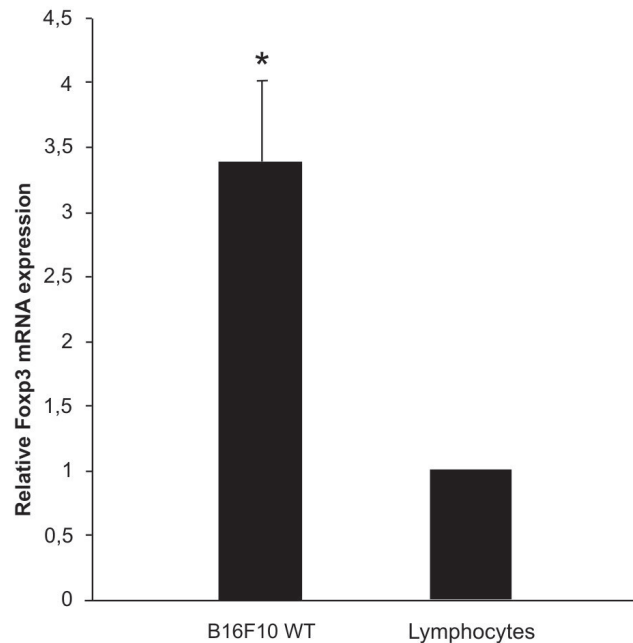


## 6. RESULTADOS

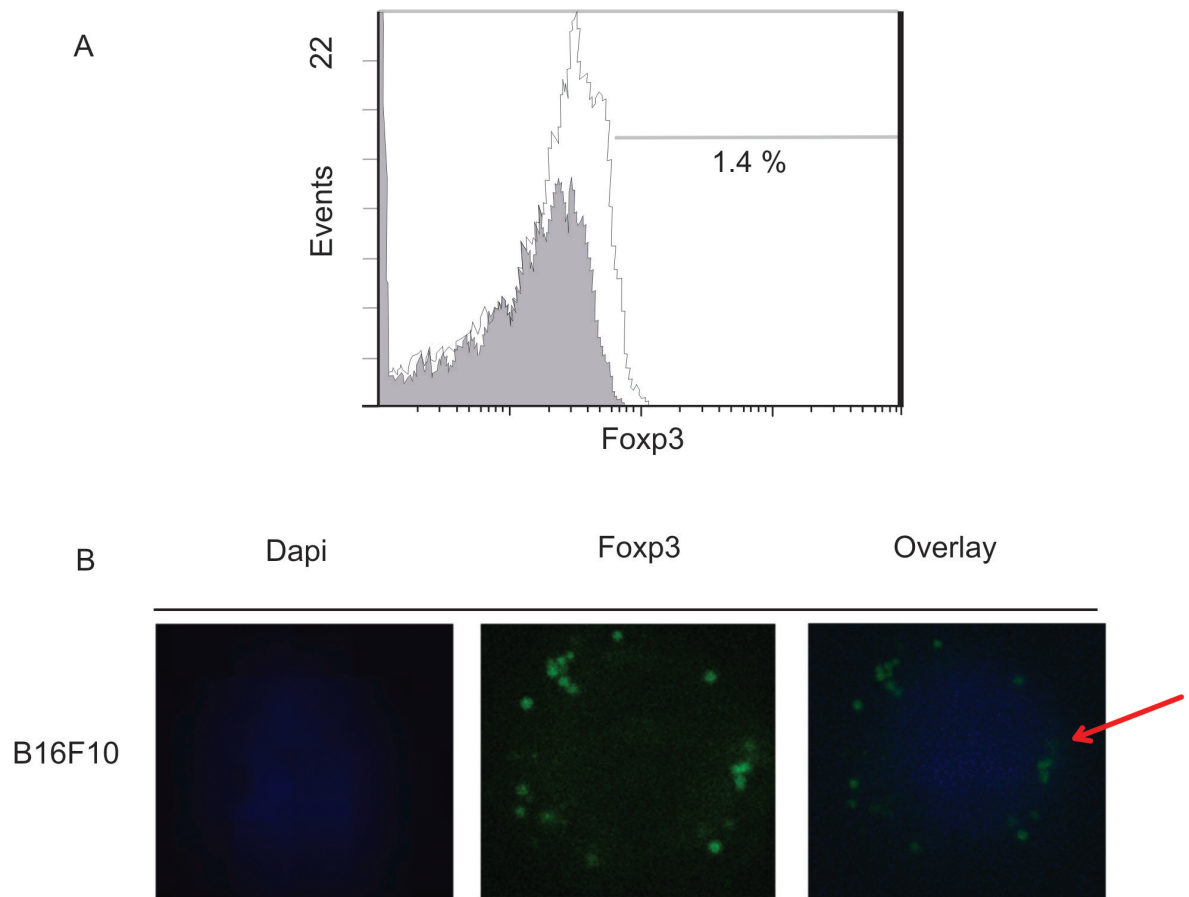
### 6.1 IN VITRO

#### 6.1.1 Detección de Foxp3 y CD25 en células de melanoma murino B16F10 wt

Se detectó por primera vez la expresión de Foxp3 en las células de melanoma murino B16F10 wt a nivel de RNAm (Figura 10) y proteína (Figura 11A y 11B), la expresión del RNAm fue 2.5 veces mayor que los linfocitos T murinos los cuales fueron usados como control positivo (Figura 10), mientras que por citometría de flujo, la expresión de Foxp3 a nivel de proteína en las células B16F10 wt fue 1.4 % (Figura 11A). Estos resultados fueron corroborados con el ensayo de inmunofluorescencia a través de microscopia confocal (Figura 11B). Se encontró que el 0.69% de las células B16F10 wt expresan CD25<sup>+</sup> mediante la técnica de citometría de flujo.



**Figura 10. Análisis de expresión del RNAm de Foxp3.** El RNAm de Foxp3 fue analizado en la línea celular de melanoma murino B16F10 wt mediante la técnica de RT-PCR tiempo real, los valores fueron normalizados usando  $\beta$ -actina como control endógeno, los linfocitos de ratón fueron utilizados como control positivo. Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes (\* $p < 0.05$ ).



**Figura 11. Análisis de expresión de la proteína de Foxp3 en células de melanoma murino B16F10 wt.** **A)** Las células B16F10 wt fueron cultivadas durante 48 h, colectadas y poseteriormente permeabilizadas y teñidas para el análisis de Foxp3 (PeCy5 de eBioscience), por citometría de Flujo. El porcentaje de células B16F10 wt Foxp3 positivas es mostrado. Los resultados son representativos de 4 experimentos realizados independientemente. La curva blanca representa la tinción específica para Foxp3, la curva en color gris representa las células control, donde las células no son teñidas. **B)** Las células B16F10 wt fueron permeabilizadas y teñidas con el anticuerpo Foxp3 (PeCy5 de eBioscience), posteriormente fueron fijadas utilizando el medio de montaje Vectashield con DAPI. El núcleo de las células fueron teñidos con DAPI (color azul) y analizadas mediante microscopia confocal. Los puntos verdes indican la expresión de Foxp3.



### 6.1.2 Producción de citocinas en la línea celular B16F10 wt

Se detectó la producción de citocinas (IL-10 (1.75 pg/ml), IL-2 (86.41 pg/ml), IFN- $\gamma$  (2.45 pg/ml) and TGF- $\beta$  (2.85 pg/ml) en el sobrenadante de la línea celular B16F10 wt mediante la técnica de Elisa los cuales se muestran en la Tabla 4.

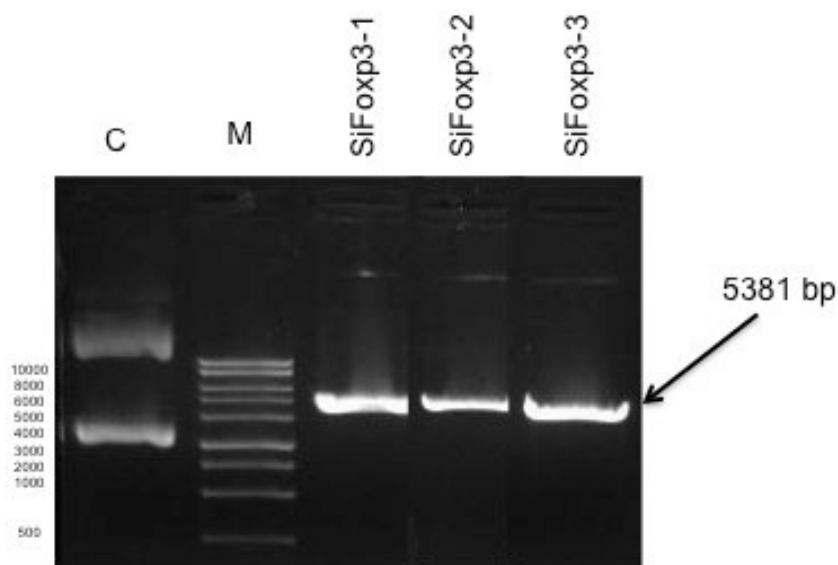
Producción de citocinas	
Citocinas	Sobrenadantes de células B16F10 wt (48 h)
IL-10	1.750 $\pm$ 0.002
<b>IL-2</b>	<b>86.410 <math>\pm</math> 5.080</b>
TGF- $\beta$	2.850 $\pm$ 0.305
INF- $\gamma$	2.450 $\pm$ 0.001

**Tabla 4. Producción de citocinas en células de melanoma murino B16F01 wt.** Se analizó la producción de citocinas en sobrenadantes de 48 horas de las células B16F10 wt, las citocinas fueron analizadas mediante ensayos de ELISA para cada citocina. La proteína total fue ajustada a 1 mg previo a los ensayos. Los datos representan el promedio de 3 experimentos independientes.



### 6.1.3 Verificación de la construcción y expresión de los plásmidos recombinantes siFoxp3-1, siFoxp3-2 y siFoxp3-3

Una vez realizado el diseño de las secuencias para silenciamiento de *Foxp3*, éstas fueron alineadas y ligadas al plásmido pGSH1-GFP. Posteriormente se realizó la transformación de bacterias competentes con las 3 construcciones y se realizó una extracción rápida de plásmidos a pequeña escala para la verificación de la transformación de cada uno de los plásmidos diseñados, los plásmidos fueron tratados con *Hind* III obteniendo los fragmentos de tamaño consistentes con el tamaño de los plásmidos (el vector control pGSH1GFP fue de 5318 pb) y los plásmidos recombinantes (SiFoxp3-1, SiFoxp3-2 and SiFoxp3-3) correspondientes al tamaño de 5381 pb fueron analizadas en un gel de agarosa al 1 % el cual fue teñido con bromuro de etidio como se muestra en la Figura 12.

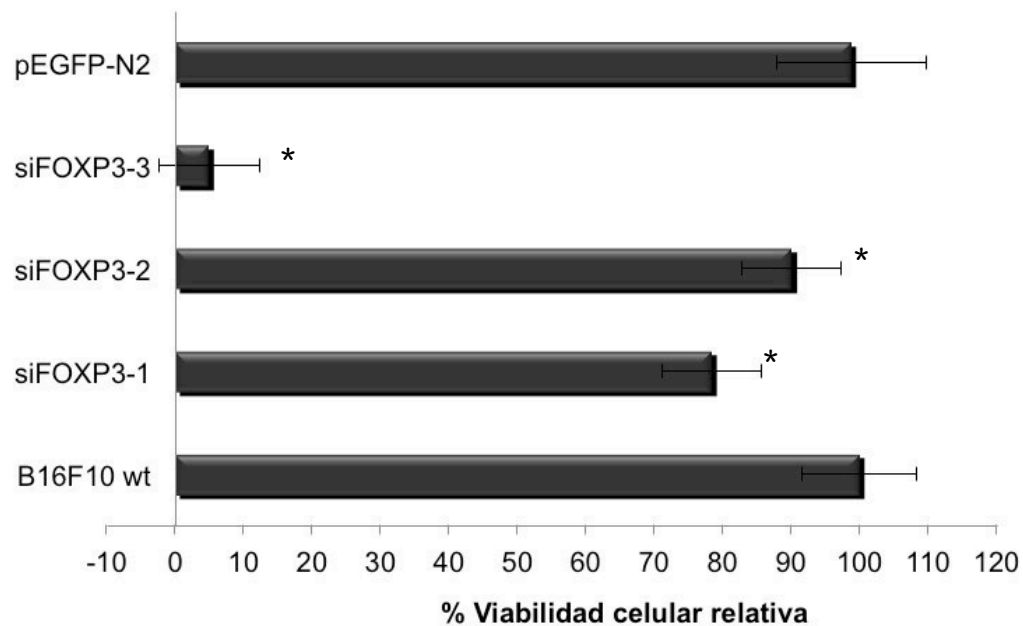


**Figura 12. Caracterización de los plásmidos recombinantes que codifican para los RNAi contra *Foxp3*.** Para probar los plásmidos recombinantes positivos, se analizaron las reacciones de digestión en gel de agarosa al 1% (TAE). Se utilizó como control el plásmido pGSH1-GFP sin digerir (C), los RNA de interferencia siFoxp3-1, siFoxp3-2 y siFoxp3-3 fueron digeridos con *Hind* III. Se utilizó un marcador de peso molecular de 1 Kb (M).

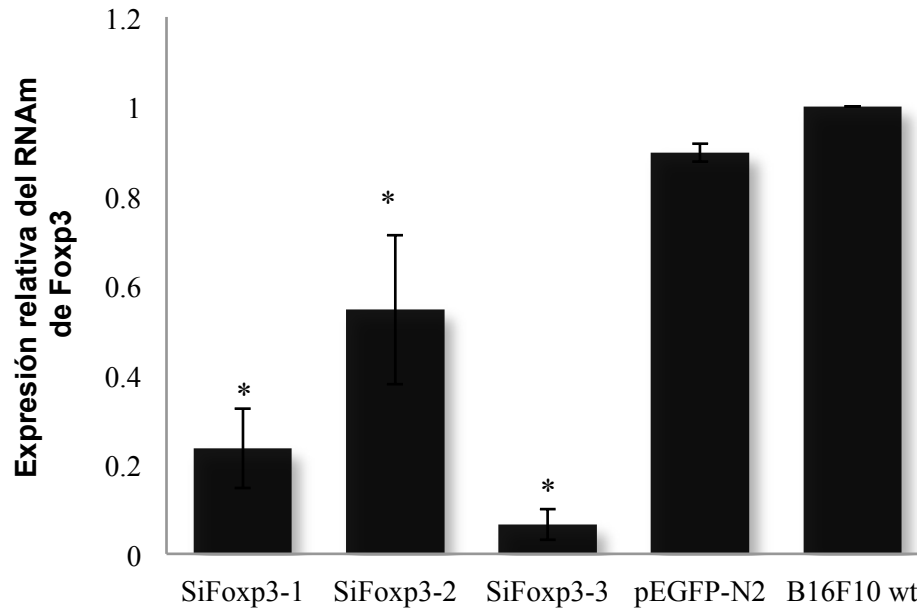


#### 6.1.4 Efecto del silenciamiento de Foxp3 sobre viabilidad de la línea celular de melanoma murino B16F10 wt.

Se determinó el efecto del silenciamiento de Foxp3 sobre la viabilidad de las células B16F10 wt utilizando los siRNA (SiFoxp3-1, SiFoxp3-2 y SiFoxp3-3). Encontrando que la transfección con siFoxp3-3 (5.01 %) afectó significativamente la viabilidad celular relativa en comparación con siFoxp3-1 (78.43 %) y siFoxp3-2 (90.16 %) sobre la línea celular B16F10 wt. Las células B16F10 wt y el plásmido pEGFP-N2 fueron usados como control (Figura 13). La expresión de Foxp3 en las células B16F10 wt transfectadas con los siRNA (SiFoxp3-1, SiFoxp3-2 y SiFoxp3-3) y no transfectadas (B16F10 wt y pEGFP-N2) fue analizada por RT-PCR tiempo real encontrando que la expresión de Foxp3 disminuye significativamente cuando es transfectada con los siRNA (siFoxp3-1 (0.236 veces), siFoxp3-2 (0.546 veces) and siFoxp3-3 (0.065 veces)) comparados con las células B16F10 wt sin transfección (1 vez) (Figura 14).



**Figura 13. Silenciamiento de Foxp3 con siRNA inhibe la proliferación de células B16F10 wt.** Las células B16F10 wt fueron ajustadas a una concentración de  $5 \times 10^3$  células e incubadas en una atmósfera de 5% de  $CO_2$  y  $37^\circ C$  durante 24 h, posteriormente las células fueron transfectadas durante 48 h con los RNA de interferencia (siFoxp3-1, siFoxp3-2 y siFoxp3-3), posteriormente se realizó el análisis de proliferación celular mediante la técnica de MTT. Los valores de viabilidad celular relativa (VCR) obtenidos con los siRNA fueron comparados con los valores de VCR de las células B16F10 wt sin transfección. Se utilizó el plásmido pEGFP-N2 como control. Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes (\* $p > 0.05$ ).



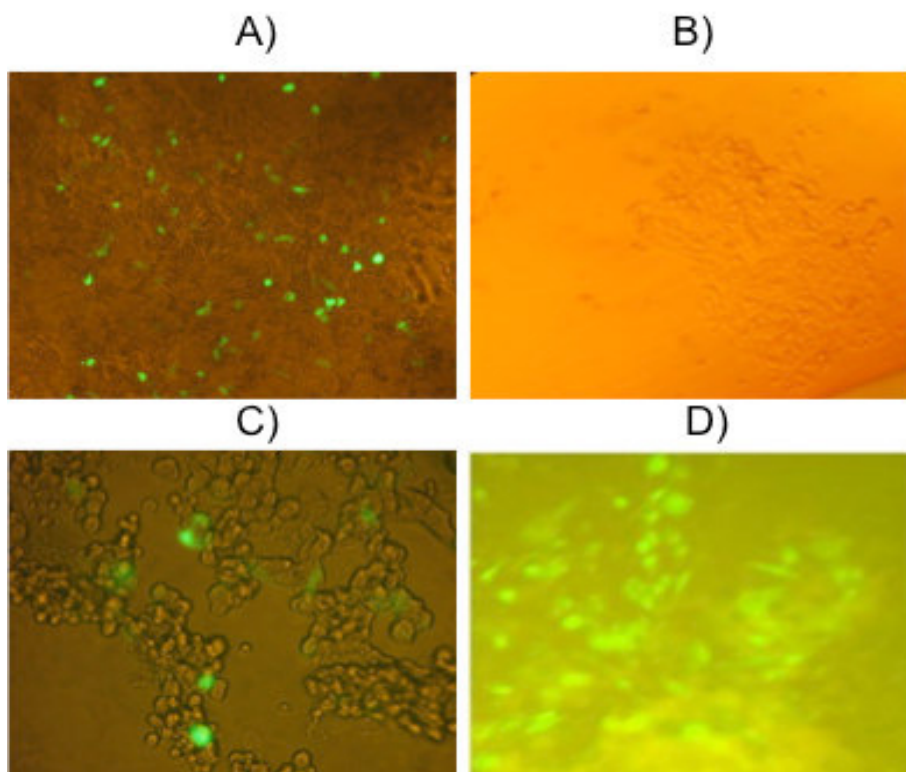
**Figura 14. Análisis de expresión de Foxp3 en células de melanoma murino B16F10 wt con transfección transiente de los RNAi.** Las células B16F10 wt fueron transfectadas con los siRNA (siFoxp3-1, siFoxp3-2 y siFoxp3-3) y posterior a 48 h fue analizada la expresión del RNAm de Foxp3 mediante RT-PCR tiempo real, los valores fueron normalizados con  $\beta$ -actina como control endógeno, como controles fueron usados el plásmido pEGFP-N2 y las células B16F10 wt. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes, se realizó la comparación estadística de los valores de siFoxp3-1, siFoxp3-2 y siFoxp3-3 con la línea B16F10 wt (\* $p < 0.05$ ).

A pesar que el siRNA siFoxp3-3 tuvo mayor efecto en el silenciamiento de Foxp3 en las células B16F10 wt y siFoxp3-3 afectaba drásticamente la viabilidad celular *in vitro* (Figura 13), y el siFoxp3-2 no afecta de manera significativa la viabilidad celular *in vitro* (Figura 13) y sus niveles de expresión de Foxp3 se mantenían altos en comparación con la transfección con siFoxp3-1 y siFoxp3-3 (Figura 14) se decidió usar el siRNA siFoxp3-1 para el establecimiento y generación de la línea celular B16F10 wt con silenciamiento estable de Foxp3 debido a que este siRNA tuvo efecto sobre la viabilidad celular (Figura 13) y permitió el establecimiento de la línea con silenciamiento de Foxp3.

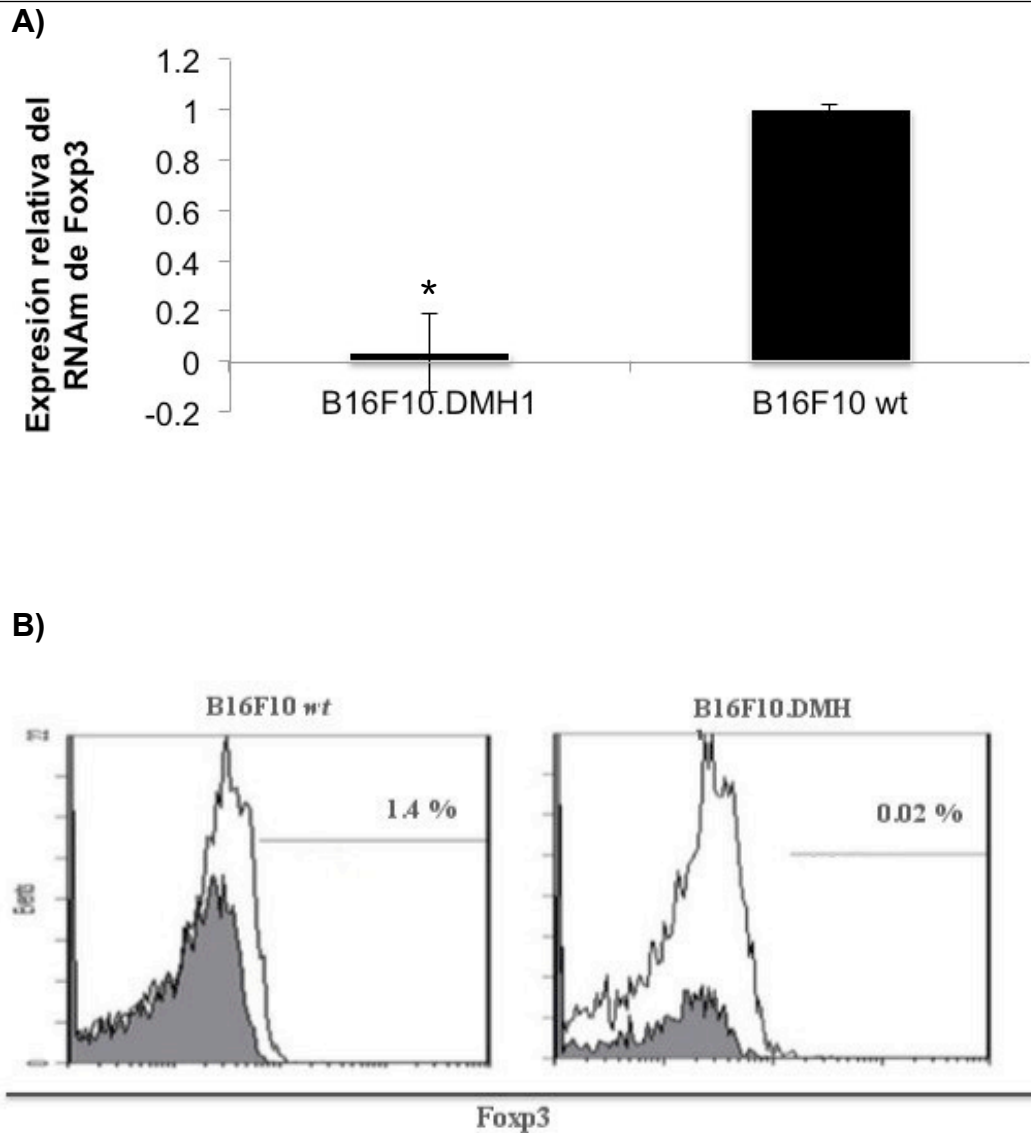


### 6.1.5 Establecimiento y generación de la línea celular B16F10.DMH1 con silenciamiento de *Foxp3*

Se transfectaron las células B16F10 *wt* con siFoxp3-2, como se menciona en la metodología este plásmido presenta la proteína verde fluorescente (GFP) para permitir la observación de las células transfectadas mediante microscopia de fluorescencia como se muestra en la Figura 15. Las células fueron seleccionadas mediante el uso del antibiótico G418 por 4 semanas siendo la concentración de 800 mg/mL la utilizada para la selección de clonas celulares positivas. Las células B16F10 con silenciamiento estable de *Foxp3* fueron identificadas como B16F10.DMH1 y fueron mantenidas con el antibiótico de selección G418 durante el estudio. Los niveles de expresión de *Foxp3* en la línea celular B16F10.DMH1 analizados por qRT-PCR (0.235 fold) y citometría de flujo (0.02 %) (Figura 16A y 16B) fueron menores que los niveles de expresión en la línea celular B16F10 *wt* (1 fold y 1.4 % respectivamente) (Figura 16A y 16B).



**Figura 15.** Transfección estable del siRNA siFoxp3-1 en células de melanoma murino B16F10 *wt*. **A, B)** Células B16F10 *wt* 24-72 horas posterior a la transfección fueron seleccionadas y mantenidas con antibiótico de selección G418. **C, D)** Clonas positivas 3-6 semanas posterior a la transfección. Las células fueron mantenidas con G418 y fueron visualizadas con microscopia confocal.



**Figura 16. Análisis de expresión del RNAm y proteína de Foxp3 en células B16F10.DMH1.**

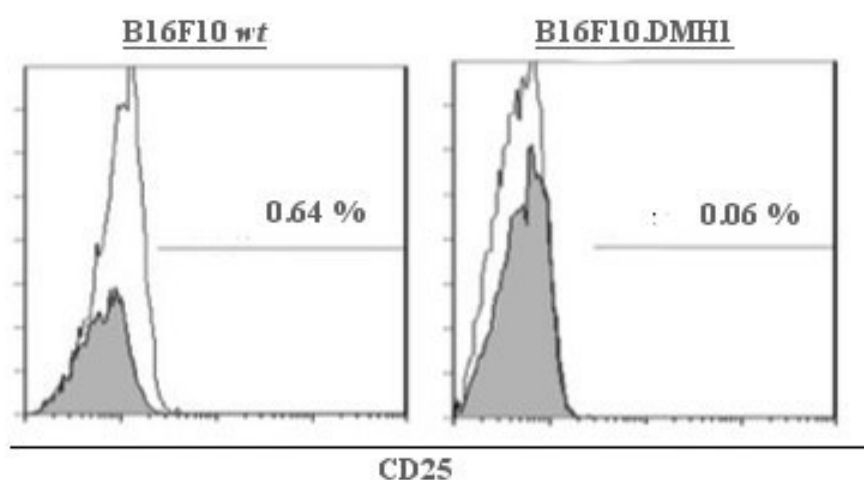
**A)** El análisis de la expresión de Foxp3 en la línea celular B16F10.DMH1 fue realizado mediante la técnica de RT-PCR tiempo real, los valores fueron normalizados con  $\beta$ -actina como control endógeno y las células B16F10 wt fueron utilizadas como control positivo. Los valores representan el promedio de 3 experimentos independientes (\* $p < 0.05$ ). **B)** Las células B16F10 wt y B16F10.DMH1 fueron permeabilizadas y teñidas con el anticuerpo anti-Foxp3 (Foxp3 PeCy5 eBioscience, USA) como se describe en materiales y métodos, posteriormente se analizó la expresión de Foxp3 mediante citometría de flujo. El porcentaje de células Foxp3<sup>+</sup> es mostrado. Los porcentajes representan el promedio de 4 experimentos independientes. La curva en color blanco representa la tinción específica para Foxp3<sup>+</sup>, mientras que la curva en color gris representa el control.





### 6.1.6 Análisis de CD25<sup>+</sup> en células B16F10.DMH1

Para determinar si el silenciamiento de *Foxp3* afecta la expresión de CD25 en la línea celular B16F10 *wt* (0.69 %), se analizó la expresión de CD25<sup>+</sup> en las células B16F10.DMH1 (0.06%) encontrando que la expresión de la proteína CD25<sup>+</sup> se encuentra disminuida (Figura 17).



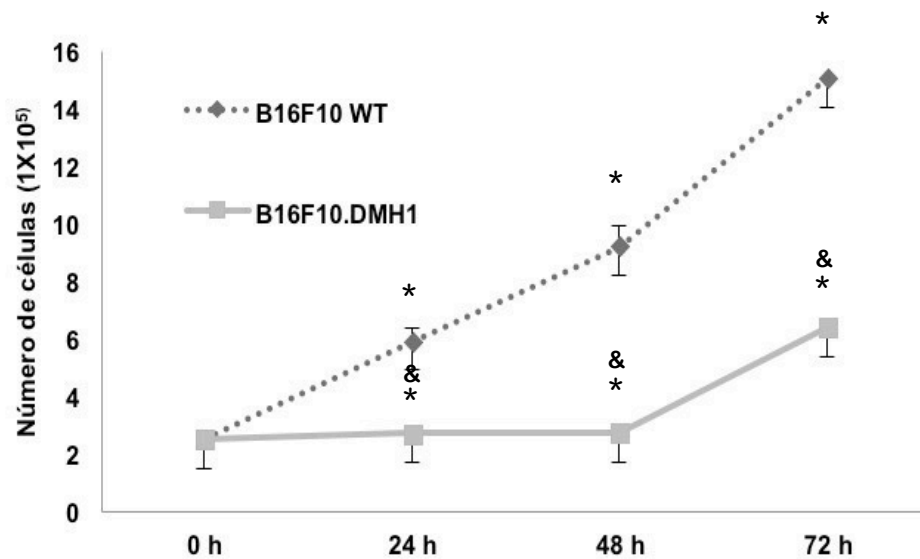
**Figura 17. Análisis de expresión de CD25.** Se evaluó la expresión de CD25 en células B16F10 *wt* y B16F10.DMH1 mediante citometría de flujo como es descrito en métodos. El porcentaje de las células CD25<sup>+</sup> es mostrado, la curva en color blanco representa la tinción específica para CD25<sup>+</sup>, mientras que la curva en color gris representan las células control.



### 6.1.7 Efecto del silenciamiento de Foxp3 en la línea celular B16F10.DMH1 sobre la proliferación celular *in vitro*

Para determinar el efecto del silenciamiento de la expresión de Foxp3 se llevó a cabo el análisis de proliferación celular mediante la tinción de azul de tripan en las células B16F10.DMH1 durante una cinética de crecimiento de 72 h.

Encontrando que la proliferación celular se ve disminuida en la línea B16F10.DMH1 ((0h ( $2.5 \times 10^5$  células), 24 h ( $2.7 \times 10^5$  células), 48 h ( $3.4 \times 10^5$  células) y 72 h ( $6.38 \times 10^5$  células)) comparado con la línea B16F10 wt ((0h ( $2.5 \times 10^5$  células), 24 h ( $5.9 \times 10^5$  células), 48 h ( $9.2 \times 10^5$  células) y 72 h ( $15.0 \times 10^5$  células)) (Figura 18).

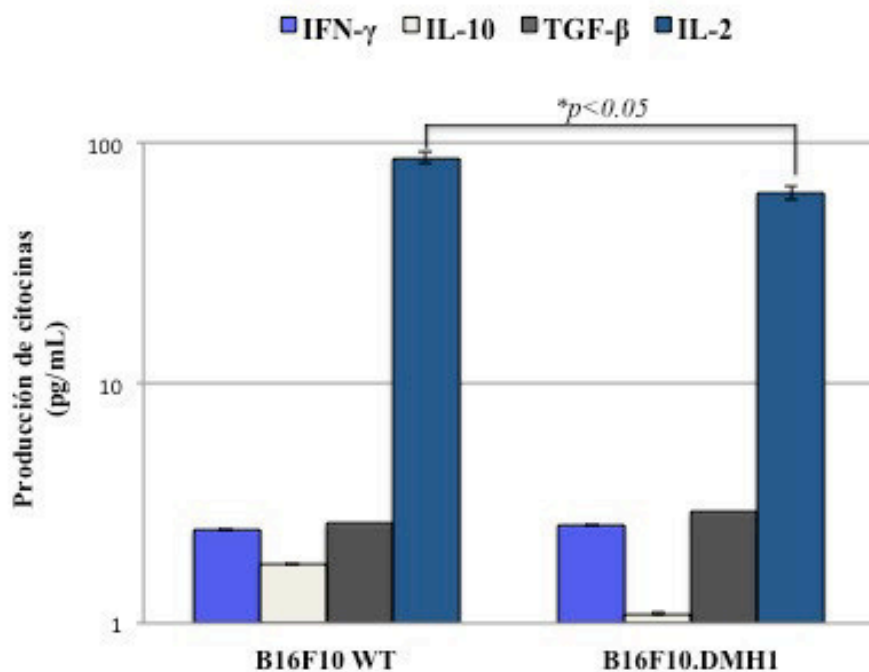


**Figura 18. Análisis de proliferación celular en las líneas B16F10 wt y B16F10.DMH1.** Las células B16F10 wt y B16F01.DMH1 ( $2.5 \times 10^5$  células/pozo) fueron sembradas en placas de 6 pozos e incubadas en una atmósfera de 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, posteriormente las células fueron contadas empleando el método de exclusión celular con azul de tripan a las 24, 48 y 72 horas. \* $p < 0.05$  (dentro de cada línea celular), & $p < 0.05$  (entre las dos líneas celulares).



### 6.1.8 Efecto del silenciamiento de Foxp3 en la línea celular B16F10.DMH1 sobre la producción de citocinas *in vitro*.

Para determinar el papel de las citocinas sobre el silenciamiento de la expresión de Foxp3 en las células B16F10.DMH1 fueron analizadas la producción de citocinas mediante la técnica de ELISA encontrando que solamente la IL-2 mostró diferencias significativas  $*p < 0.05$  en su producción entre las células B16F10 *wt* y B16F10.DMH1 (86.41 pg/mL y 62.35 pg/mL respectivamente). En el resto de las citocinas evaluadas no se encontró diferencia en cuanto a su producción en las células B16F10 *wt* ((TGF- $\beta$  (2.85 pg/mL), IL-10 (1.75 pg/mL) y INF- $\gamma$  (2.45, pg/mL)) y B16F10.DMH ((TGF- $\beta$  (2.73 pg/mL), IL-10 (1.72 pg/mL) y INF- $\gamma$  (2.55 pg/mL)) (Figura 19 y Tabla 5).



**Figura 19. Producción de citocinas en las líneas celulares B16F10 *wt* y B16F10.DMH1.** Las células B16F10 *wt* y B16F10.DMH1 fueron ajustadas y cultivadas a una concentración celular de  $2.5 \times 10^5$  en placas de 6 pozos e incubadas en una atmósfera de 37° C y 5% CO<sub>2</sub> durante 48 horas. Posteriormente el sobrenadante celular fue colectado y se ajustó la concentración de proteína a 1 mg para su posterior análisis de producción de citocinas (IL-2, INF- $\gamma$ , TGF- $\beta$  e IL-10) mediante ELISA (Invitrogen USA). Los datos representan el promedio de 3 experimentos independientes ( $*p < 0.05$ ).



Células	Citometría de flujo %		Producción de citocinas en sobrenadantes celulares (pg/mL)			
	Foxp3	CD25	IL-2	TGF- $\beta$	IL-10	INF- $\gamma$
B16F10 wt	1.40	0.69	86.41 $\pm$ 5.08	2.85 $\pm$ 0.06	1.75 $\pm$ 0.01	2.45 $\pm$ 0.01
B16F10.DMH1	0.02 <sup>&amp;</sup>	0.06 <sup>&amp;</sup>	62.35 $\pm$ 7.34 <sup>&amp;</sup>	2.73 $\pm$ 0.12	1.72 $\pm$ 0.01	2.55 $\pm$ 0.02

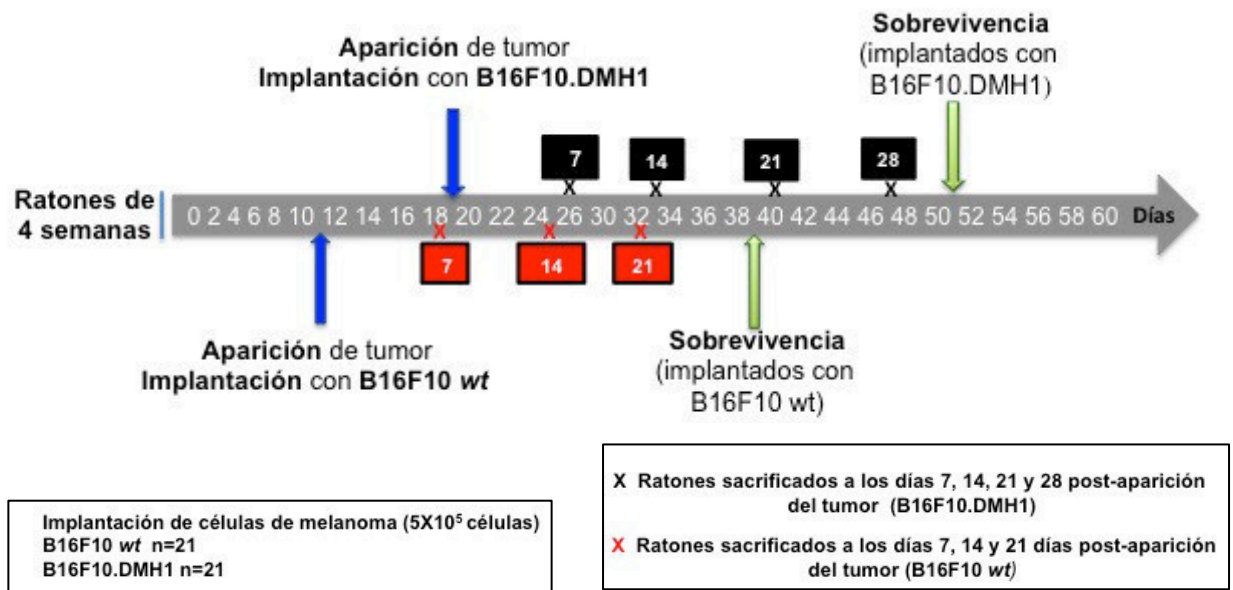
**Tabla 5. Valores de expresión de Foxp3, CD25 y producción de citocinas en las líneas celulares B16F10 wt y B16F1.DMH1 in vitro.** Los valores de expresión de Foxp3 y CD25 fueron determinados por citometría de flujo, y los valores obtenidos en el análisis de producción de citocinas fueron determinados por ensayos de Elisa como es mencionado anteriormente. Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes, <sup>&</sup> $p < 0.05$  representa la diferencia encontrada entre ambas líneas celulares.



## 6.2 *IN VIVO*

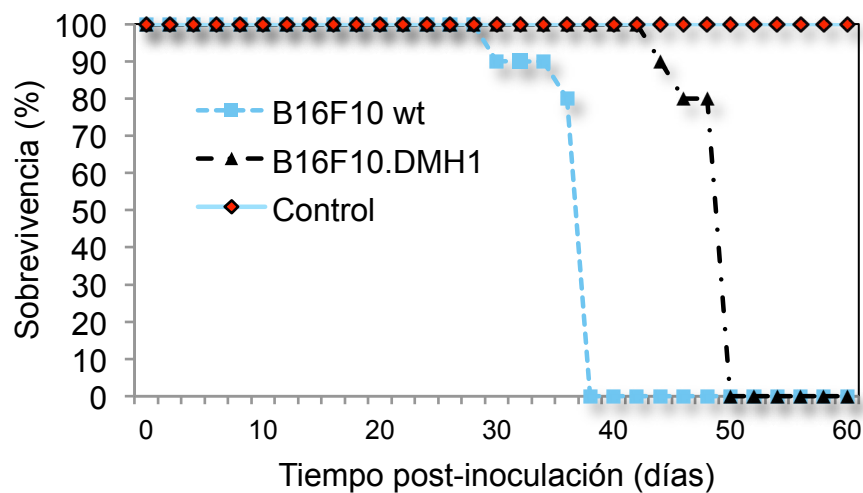
### 6.2.1 El silenciamiento de *Foxp3* en las células B16F10.DMH1 afecta el desarrollo del melanoma murino

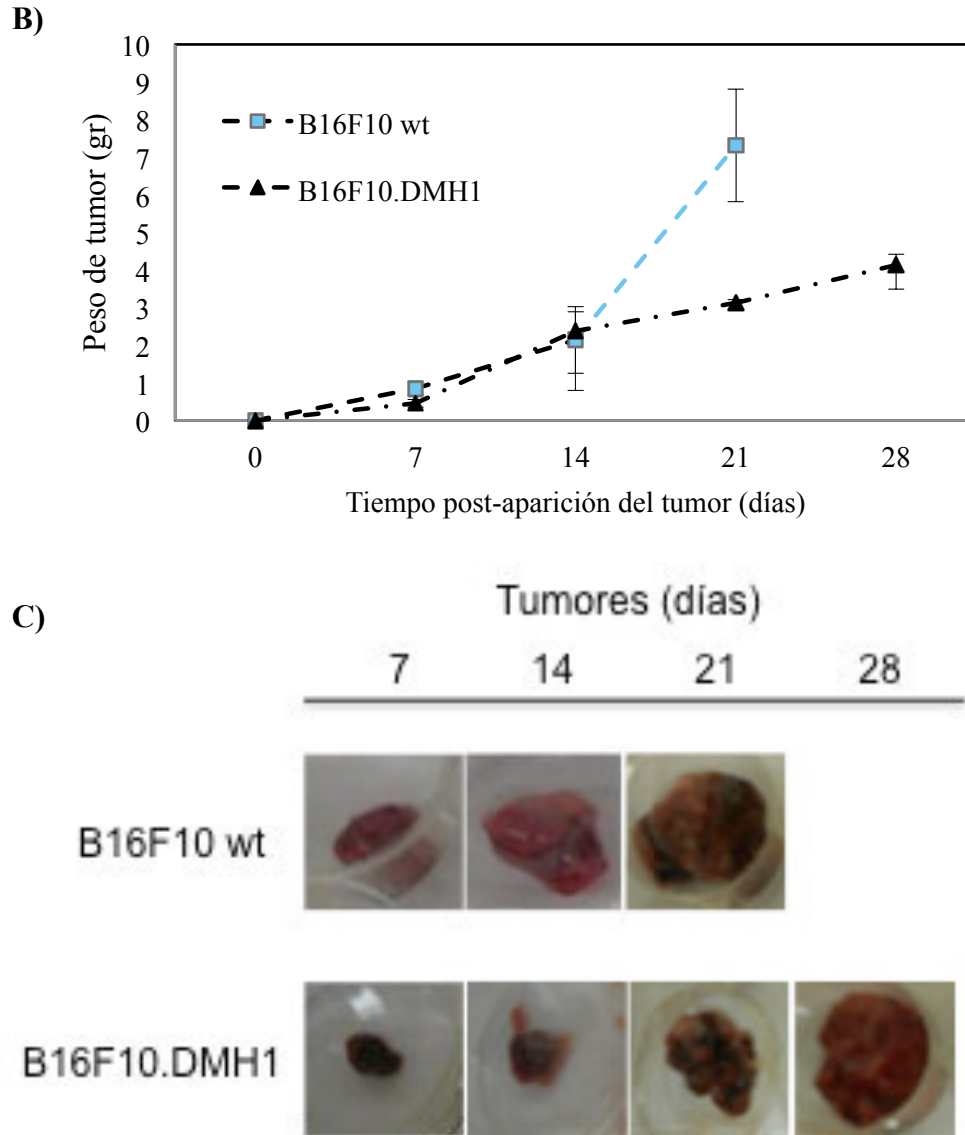
Para corroborar si la expresión de *Foxp3* participa en el crecimiento del melanoma murino, se evaluó el tiempo de aparición visible del tumor en grupos de ratones C57BL6 inoculados subcutáneamente con las líneas celulares B16F10 *wt* y B16F10.DMH1 encontrando que el tiempo de aparición de tumor en cada grupo fue al día 11 y al día 19 post-inoculación (Figura 20). Posteriormente fue evaluada la sobrevivencia en ambos grupos y se observó una mayor sobrevida en ratones inoculados con las células B16F10.DMH1 (sobrevivieron hasta el día 51 post-inoculación del tumor) comparados con los ratones inoculados con las células B16F10 *wt* (sobrevivieron hasta el día 39 post-inoculación del tumor) (Figura 20 y 21A). Los tumores de ambos grupos de ratones fueron removidos y pesados bajo condiciones de asepsia como se menciona en materiales y métodos; debido al tiempo de sobrevida en los ratones inoculados con las células B16F10 *wt* se decidió colectar los tumores a los días 7, 14 y 21 post-aparición del tumor y a los días 7, 14, 21 y 28 post-aparición de tumor en los ratones inoculados con las células B16F10.DMH1 (Figura 20) encontrando que el peso de los tumores colectados de los ratones inoculados con las células B16F10.DMH1 en los días 7 (0.45 g), 14 (2.14 g), 21 (3.13 g) y 28 (4.13 g) fue menor que el peso de los tumores colectados de los ratones inoculados con las células B16F10 *wt* a los días 7 (0.85 g), 14 (2.39) y 21 (7.31) (Figura 21B y 21C).



**Figura 20.** Línea de tiempo de inducción y desarrollo del melanoma murino inducido con células B16F10 wt y B16F10.DMH1. Se muestra el tiempo de aparición del tumor, los días de sacrificio y recolección de tumores y bazo de los ratones inoculados con células B16F10 wt y B16F10.DMH1 durante el desarrollo del melanoma murino.

A)





**Figura 21. Efecto de la implantación de células B16F10 wt y B16F10.DMH1 durante la evolución tumoral.** Dos grupos de ratones C57BL/6 ( $n = 21/\text{grupo}$ ) fueron inoculados con las células de melanoma murino B16F10 wt y B16F10.DMH1 respectivamente ( $5 \times 10^5$  células). **A)** Posterior a la inoculación con las células de melanoma murino se determinó el rango de sobrevivencia en cada grupo de ratones. En el grupo control los ratones no fueron inoculados con células de melanoma. **B)** los tumores fueron removidos quirúrgicamente bajo condiciones de asepsia durante el crecimiento del melanoma a los 7, 14 y 21 días post-aparición de tumor en ratones inoculados con células B16F01 wt y a los 7, 14, 21 y 28 días post-aparición de tumor en ratones inoculados con células B16F10.DMH1 ( $*p < 0.05$ ). **C)** Observación visual de tumores colectados durante el desarrollo del melanoma en ambos grupos.



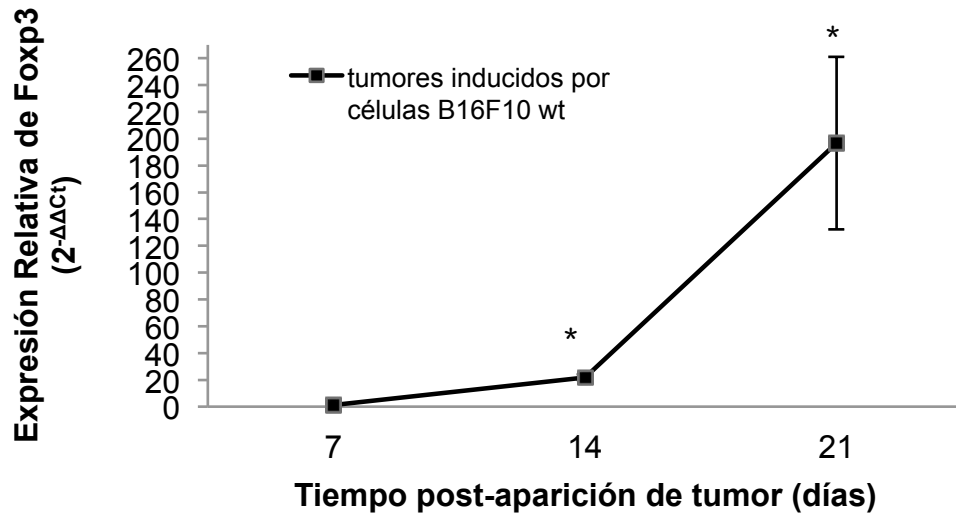
### **6.2.2 Expresión de Foxp3 en los tumores**

Para determinar el papel de Foxp3 en el crecimiento tumoral, los tumores colectados durante el desarrollo del melanoma fueron analizados para determinar la expresión del mRNA de Foxp3 mediante qRT-PCR encontrando un incremento en la expresión relativa de Foxp3 en la línea B16F10 *wt* de una manera dependiente de tiempo durante el desarrollo tumoral (7 (1-vez), 14 (21.9-veces) y 21 (196.7-veces) días post-aparición del tumor) (Figura 22A), mientras que en los tumores colectados de los ratones inoculados con las células B16F10.DMH1 se encontraron niveles bajos de expresión relativa de Foxp3 durante los días 7 (1-vez), 14 (1.03-veces) y 21 (0.26-veces) post-aparición del tumor comparados con la línea la línea B16F10 *wt* (Figura 22A, 22B y Tabla 6) sin embargo estos niveles de expresión relativa se incrementaron al día 28 (12.9-veces) post-aparición del tumor (Figura 22B). Para descartar que los niveles de expresión tumoral de Foxp3 pudiera estar influenciado por la presencia de linfocitos infiltrantes de tumor, se empleó un método de selección positiva mediante Dynabeads para aislar linfocitos T infiltrantes del tumor y posteriormente evaluar la expresión de Foxp3 en las células tumorales mediante citometría de flujo como esta descrito en material y métodos, encontrando el mismo comportamiento de expresión de Foxp3 durante el desarrollo tumoral 7 (1.47%), 14 (21.57%) y 21 (89.25%) días (Figura 23A) en las células B16F10 *wt* intratumorales mientras que en las células B16F10.DMH1 intratumorales se mostró una expresión de Foxp3 baja durante los días desarrollo tumoral 7 (0.02 %), 14 (0.04 %) y 21 (0.40 %) comparadas con las B16F10 *wt* intratumorales, sin embargo esta expresión se ve incrementada al día 28 (12.82 %) post aparición de tumor (Figura 23B).

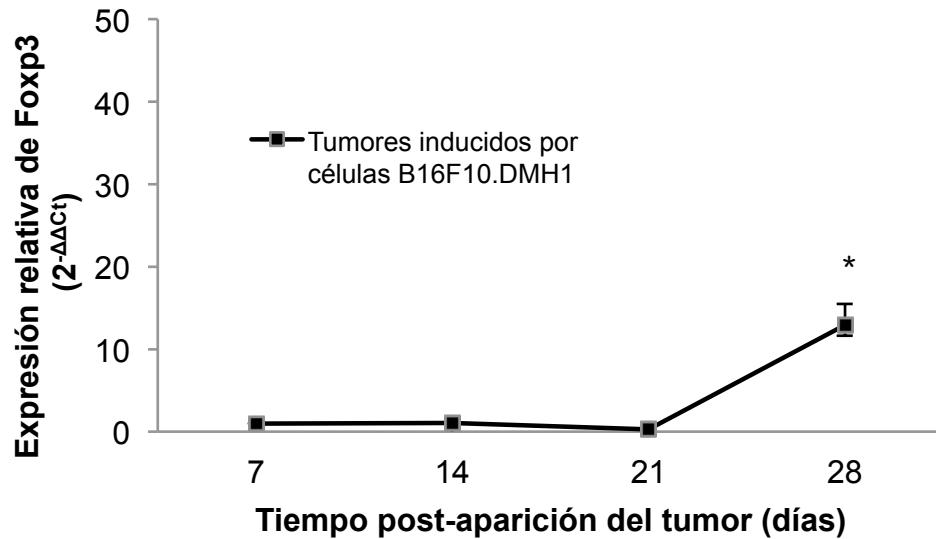




A)



B)

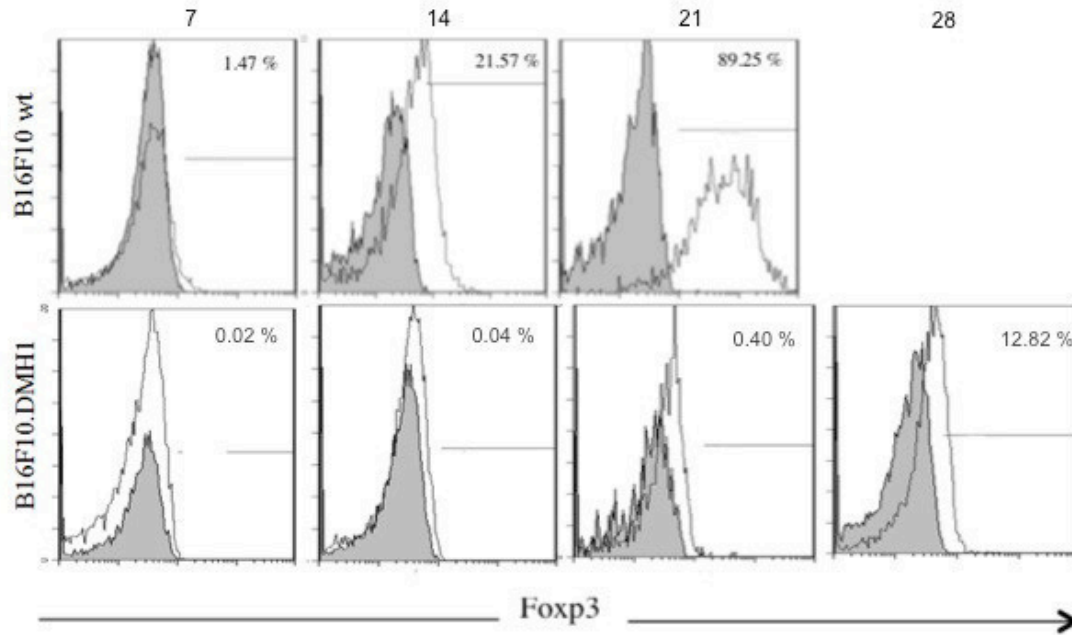


**Figura 22. Análisis de expresión de *Foxp3* durante el desarrollo de melanoma murino inducido con células B16F10 wt y B16F10.DMH1.** A) Los tumores de melanoma inducidos con células B16F10 wt fueron colectados durante el desarrollo tumoral a los días 7, 14 y 21 días post-aparición del tumor, B) mientras que los tumores inducidos con las células B16F10.DMH1 fueron colectados a los días 7, 14, 21 y 28 días post-aparición del tumor. Posteriormente la expresión relativa del RNAm de *Foxp3* fue determinado por RT-PCR tiempo real en ambos grupos de tumores. Los datos obtenidos representan el promedio de tres experimentos independientes y \* $p < 0.05$  representa una diferencia significativa de los valores con respecto el día 7.



Tumors collected during tumor growth (days)	<i>Foxp3</i> C <sub>T</sub>	$\beta$ -actina C <sub>T</sub>	$\Delta C_T$ (Avg. <i>Foxp3</i> C <sub>T</sub> -Avg. $\beta$ -actina C <sub>T</sub> )	$\Delta\Delta C_T$ (Avg. $\Delta C_T$ - $\Delta C_{T \cdot B16F10wt}$ )	Normalized <i>Foxp3</i> amount relative to B16F10 wt $2^{-\Delta\Delta C_T}$
B16F10 wt					
7	22.25 $\pm$ 0.127	21.785 $\pm$ 0.0919	0.465 $\pm$ 0.0353	0.00 $\pm$ 0.0353	1
14	14.67 $\pm$ 0.0565	18.654 $\pm$ 0.1612	-3.984 $\pm$ 0.1046	0.00 $\pm$ 0.1046	1
21	11.3 $\pm$ 0.452	18.415 $\pm$ 0.0070	-7.115 $\pm$ 0.4454	0.00 $\pm$ 0.4454	1
B16F10.DMH1					
7	24.85 $\pm$ 0.3111	20.815 $\pm$ 0.2757	4.035 $\pm$ 0.0353	3.57 $\pm$ 0.0707	0.0842 $\pm$ 0.00412
14	22.14 $\pm$ 0.01414	21.37 $\pm$ 0.4808	0.77 $\pm$ 0.49497	4.754 $\pm$ 0.5996	0.0386 $\pm$ 0.01562
21	31.265 $\pm$ 1.789	30.45 $\pm$ 0.9050	0.815 $\pm$ 0.8838	7.93 $\pm$ 0.43840	0.00419 $\pm$ 0.0012

**Tabla 6. Análisis de expresión de *Foxp3* durante el desarrollo de melanoma murino.** Se realiza una comparación de los valores de expresión de *Foxp3* en los tumores inducidos con B16F10.DMH1 con respecto los tumores inducidos con células B16F10 wt durante el desarrollo del melanoma (7, 14 y 21 días).

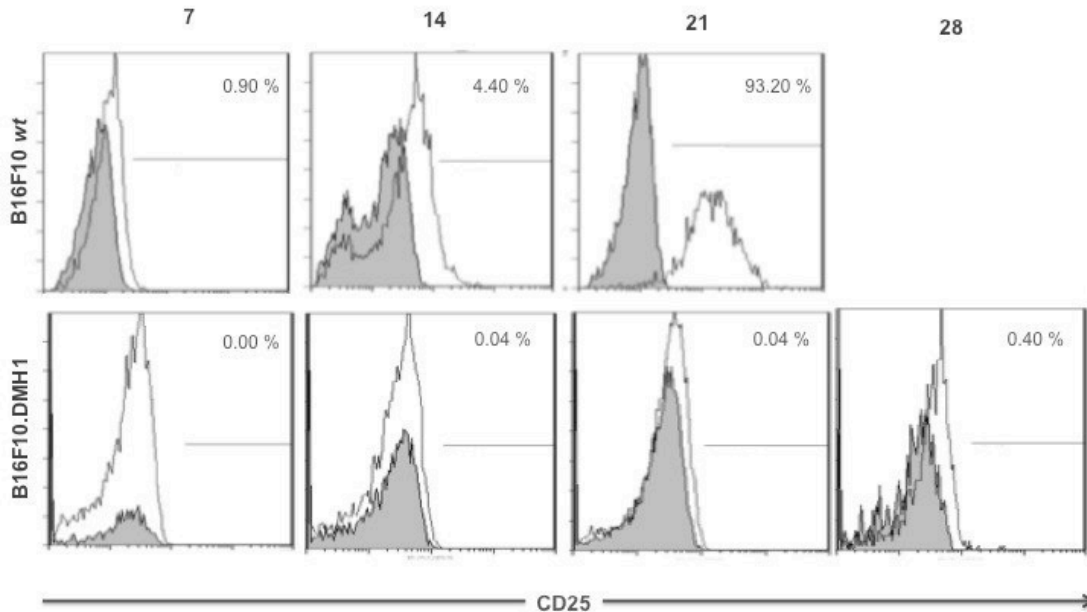


**Figura 23. Análisis de expresión de *Foxp3* durante el crecimiento tumoral en células B16F10 wt y B16F10.DMH1 intratumorales.** Se colectaron los tumores durante el desarrollo tumoral en ratones inoculados con células B16F10 wt (7, 14 y 21 días post-aparición de tumor) y B16F10.DMH1 (7, 14, 21 y 28 días post-aparición de tumor) bajo condiciones de asepsia, y posteriormente las células B16F10 wt y B16F10.DMH1 intratumorales fueron aisladas por separación magnética negativa para su posterior análisis de *Foxp3* por citometría de flujo. A) Muestra el porcentaje de la expresión de *Foxp3* en células B16F10 wt intratumorales y B) muestra el porcentaje de la expresión de *Foxp3* en células B16F10.DMH1 intratumorales durante el desarrollo del melanoma. Se utilizó el anticuerpo *Foxp3* (PECy5 eBioscience, USA). La curva en color blanco representa la tinción específica para la expresión de *Foxp3* y la curva en color gris representa el control.



### 6.2.3 Expresión de CD25 en tumores

Debido al efecto del silenciamiento de *Foxp3* sobre la expresión de CD25 en las células B16F10 *in vitro* se determinó el papel de CD25 durante el desarrollo de melanoma murino. Aislado las células tumorales mediante selección negativa por Dynabeads tal como se menciona en material y métodos. Encontrando un incremento en la expresión de CD25 durante el crecimiento del tumor a los 7 (0.90 %), 14 (4.40 %) y 21 (93.20 %) días post-aparición del tumor en las células B16F10 *wt* intratumorales, mientras que la expresión de CD25 en las células B16F10.DMH1 intratumorales mostró una baja expresión durante el crecimiento tumoral 7 (0.0 %), 14 (0.04 %), 21 (0.04 %) and 28 (0.40 %) comparado con las células B16F10 *wt* intratumorales (Figura 24).



**Figura 24. Análisis de expresión de CD25 en células de melanoma murino B16F10 *wt* y B16F10.DMH1 intratumorales.** Tumores inducidos con las células B16F10 *wt* fueron colectados bajo condiciones de asepsia a los días 7, 14 y 21 post-aparición del tumor y a los 7, 14, 21 y 28 días post-aparición del tumor inducidos con células B16F10.DMH1, posteriormente las células intratumorales fueron aisladas de los tumores como es descrito en materiales y métodos, y fue determinada la expresión de CD25 por citometría de flujo a) muestra el porcentaje de la expresión de CD25<sup>+</sup> en células B16F10 *wt* intratumorales y b) muestra el porcentaje de la expresión de CD25<sup>+</sup> en células B16F10.DMH1 intratumorales durante el crecimiento del tumor. Las células fueron ajustadas y teñidas con el anticuerpo anti-CD25 PE (eBioscience, USA). La curva en color blanco representa la tinción específica para la expresión de CD25<sup>+</sup> y la curva en color gris representa el control.



#### 6.2.4 Producción de citocinas

Con la finalidad de determinar el efecto del silenciamiento de *Foxp3* sobre la producción de citocinas (IL-10, IL-2, INF $\gamma$  y TGF $\beta$ ), se analizó su producción en los tumores de melanoma inducidos con las células B16F10 *wt* (colectados a los 7, 14 y 21 días post-aparición del tumor) y B16F10.DMH1 (colectados a los 7, 14, 21 y 28 días post-aparición del tumor). Al llevar a cabo la comparación estadística dentro de cada grupo, se encontró diferencia significativa (\* $p < 0.05$ ) para la producción de IL-10 en el día 21 de ambos grupos y a los 28 días para el grupo de los tumores inducidos con las células B16F10.DMH1. Al analizar la producción de IL-2, e INF- $\gamma$ , se encontraron diferencias significativas (\* $p < 0.05$ ) en su producción en los días 14 y 21 de ambos grupos y 28 días del grupo de los tumores inducidos con las células B16F10.DMH1. No se encontró diferencia significativa para la producción de TGF $\beta$  (\* $p < 0.05$ ) (Tabla 7).

La comparación estadística entre ambos grupos de tumores (inducidos con células B16F10 *wt* y B16F10.DMH1) durante el desarrollo del melanoma mostró una disminución significativa en la producción de IL-2 (días 7, 14 y 21), IL-10 y TGF- $\beta$  (día 21) y un incremento significativo de INF- $\gamma$  (días 7, 14 y 21) en tumores inducidos con células B16F10.DMH1 (& $p < 0.05$ ) (Tabla 7).

Tumores inducidos con células B16F10 <i>wt</i>				Tumores inducidos con células B16F10.DMH1			
Producción de <i>citocinas</i> pg/mL durante el desarrollo tumoral (días)							
Citocinas	7	14	21	7	14	21	28
IL-10	0.53 ± 0.01	1.36 ± 0.01	3.90 ± 0.43*	0.23 ± 0.03	1.06 ± 0.82	2.04 ± 0.14* <sup>&amp;</sup>	2.89 ± 0.11*
IL-2	4.06 ± 0.23	9.93 ± 2.05*	18.89 ± 2.43*	2.14 ± 0.20 <sup>&amp;</sup>	3.99 ± 0.0.91* <sup>&amp;</sup>	5.39 ± 0.98* <sup>&amp;</sup>	8.56 ± 1.29*
TGF-β	1.27 ± 0.41	1.18 ± 0.86	1.89 ± 0.19	0.78 ± 0.63	0.89 ± 0.03	0.99 ± 0.04 <sup>&amp;</sup>	1.23 ± 0.53
INF-γ	20.38 ÷ 1.20	13.65 ± 1.80*	4.45 ± 1.98*	32.33 ± 2.23 <sup>&amp;</sup>	23.03 ± 1.89* <sup>&amp;</sup>	12.33 ± 1.33* <sup>&amp;</sup>	10.56 ± 1.57*

**Tabla 7. Producción de citocinas en tumores inducidos con células B16F10 *wt* y B16F10.DMH1 durante el crecimiento del tumor.** Los tumores inducidos con las células B16F10 *wt* fueron colectados a los días 7, 14 y 21, mientras que los tumores inducidos con las células B16F10.DMH1 fueron colectados a los días 7, 14, 21 y 28 post-aparición del tumor, posteriormente fue medida la producción de citocinas (IL-10, IL-2, TGF- $\beta$  and INF- $\gamma$ ) mediante ELISA (de acuerdo a las especificaciones del fabricante para cada citocina) en sobrenadantes de tumores colectados durante el desarrollo del melanoma. La proteína total fue ajustada a 1 mg previo al análisis. Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes. \* $p < 0.05$  indica la diferencia significativa dentro de cada grupo durante el desarrollo del melanoma, & $p < 0.05$  indica la diferencia significativa entre los días del desarrollo tumoral de ambos grupos.

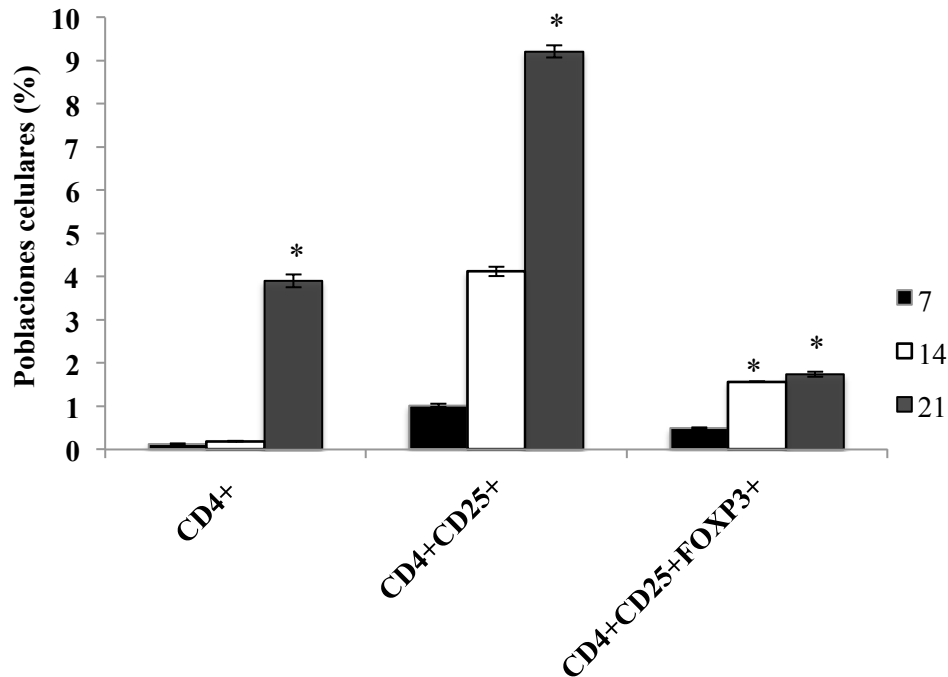


### 6.2.5 Evaluación de Linfocitos T CD4<sup>+</sup> infiltrantes de tumor

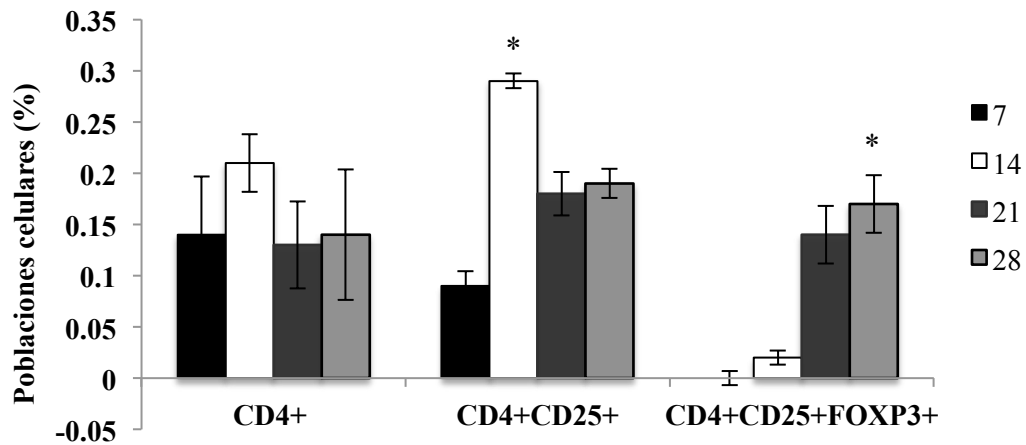
Con la finalidad de determinar si la expresión de Foxp3 en los tumores inducidos con las células B16F10 *wt* y B16F10.DMH1 tenían algún efecto sobre las poblaciones de linfocitos T infiltrantes de tumor (CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>), se analizó su expresión en los linfocitos T infiltrantes provenientes de tumores de melanoma inducidos con las células B16F10 *wt* (linfocitos T aislados de tumores colectados a los 7, 14 y 21 días post-aparición del tumor) y B16F10.DMH1 (linfocitos T aislados a los 7, 14, 21 y 28 días post-aparición del tumor). Al llevar a cabo la comparación estadística dentro del grupo de tumores inducidos con B16F10 *wt* se encontró un incremento de las poblaciones de linfocitos T (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) en una manera dependiente del tiempo y del peso del tumor durante el desarrollo del melanoma (7, 14 y 21 días), se observó una diferencia significativa en las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (día 21) y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (día 14 y 21) (\*p<0.05) (Figure 25A y Tabla 8). Al analizar estadísticamente el grupo de tumores inducidos con B16F10.DMH1, se encontró una diferencia significativa en la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> al día 14 y al día 28 en la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>, además no se mostró diferencia significativa en la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Figure 25B y Tabla 8). Al realizar la comparación estadística de ambos grupos (TIL provenientes de ratones con melanoma inducido con células B16F10 *wt* y B16F10.DMH1 respectivamente), encontrando en ratones con tumor derivados de la línea celular B16F10.DMH1, una disminución, en las poblaciones de linfocitos T infiltrantes de tumor; CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (día 14) y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (día 7, 14 y 21) mientras que la población CD4<sup>+</sup> no fue afectada (&p<0.05) (Tabla 8).



A)



B)



**Figura 25. Evaluación de células T  $CD4^+$ ,  $CD4^+CD25^+$  y  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  en linfocitos infiltrantes de tumor durante el desarrollo del melanoma murino inducido con células B16F10 wt y B16F10.DMH1.** Tumores de ratones inoculados con A) células B16F10 wt y B) B16F10.DMH1 fueron colectados bajo condiciones de asepsia, y los linfocitos infiltrantes de tumor fueron aislados mediante selección negativa. Posteriormente las poblaciones celulares fueron analizadas por citometría de flujo utilizando el kit Mouse Regulatory T cell staining (PE-Cy5 Foxp3 FJK-16s, FITC CD4, PE CD25) de eBioscience, USA. Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes. \* $p < 0.05$  indica la diferencia significativa dentro de cada grupo con respecto al día 7 durante el desarrollo del melanoma.



Análisis de poblaciones celulares (%)			
Días post-aparición de tumor	CD4 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup>
<b>B16F10 wt</b>			
7	0.12 ± 0.02	1.02 ± 0.03	0.49 ± 0.01
14	0.19 ± 0.01	4.12 ± 0.11*	1.57 ± 0.01*
21	3.90 ± 0.15*	9.21 ± 0.14*	1.74 ± 0.06*
<b>B16F10.DMH1</b>			
7	0.14 ± 0.06	0.09 ± 0.01	0 ± 0.01 <sup>&amp;</sup>
14	0.21 ± 0.03	0.29 ± 0.01* <sup>&amp;</sup>	0.02 ± 0.01 <sup>&amp;</sup>
21	0.13 ± 0.04	0.18 ± 0.02	0.14 ± 0.03 <sup>&amp;</sup>
28	0.14 ± 0.06	0.19 ± 0.01	0.17 ± 0.03*

**Tabla 8. Porcentaje de poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> infiltrantes de tumor durante el desarrollo de melanoma murino inducido con células B16F10 wt y B16F10.DMH1.** Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes, \* $p < 0.05$  indica la diferencia significativa dentro de cada grupo durante el desarrollo del melanoma y <sup>&</sup> $p < 0.05$  indica la diferencia significativa entre los días del desarrollo tumoral de ambos grupos.



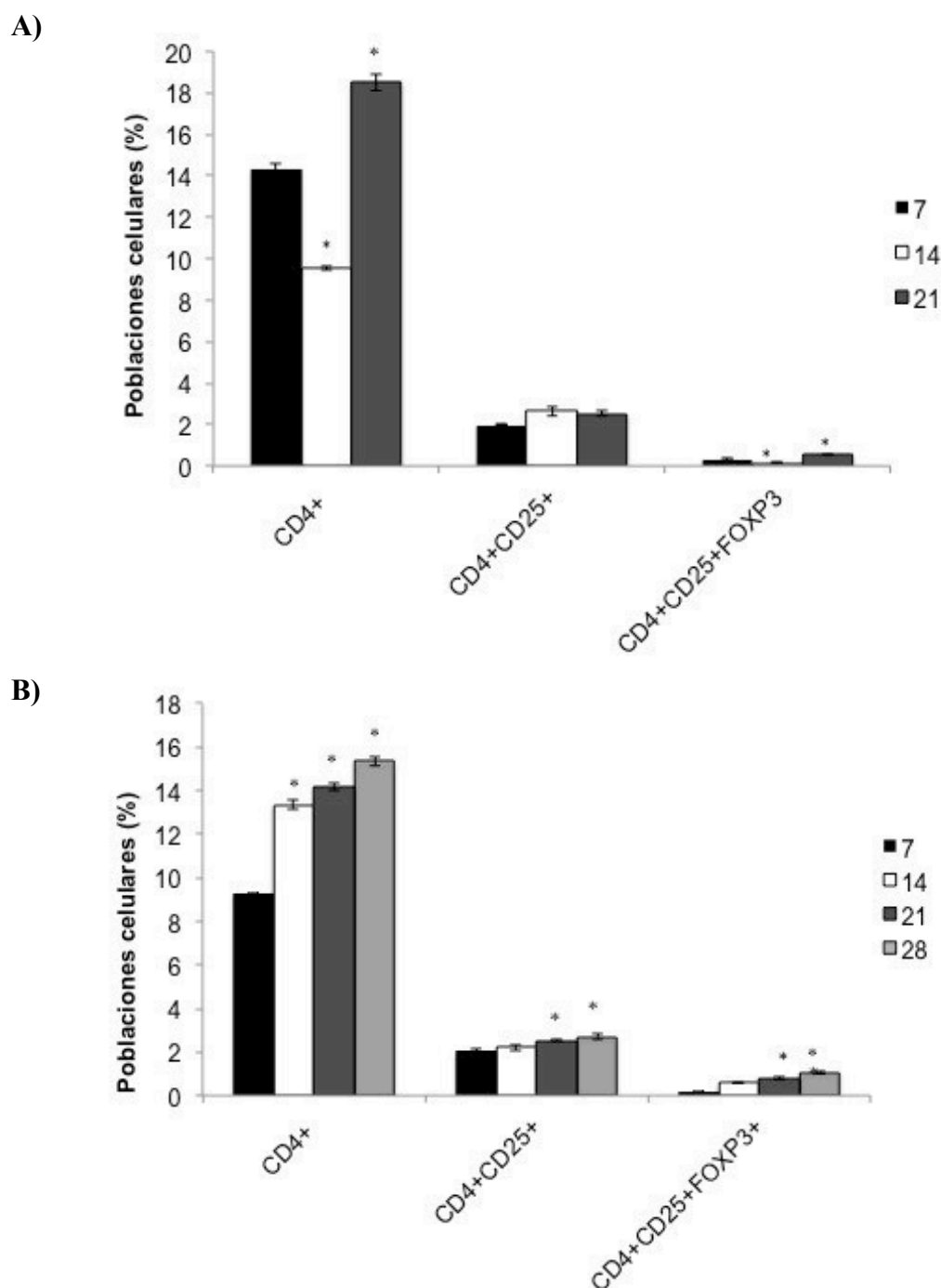
### 6.2.6 Evaluación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en células de bazo

Con la finalidad de determinar el efecto del silenciamiento de *Foxp3* sobre poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de bazo en melanoma murino, se evaluaron estas poblaciones en grupos de ratones con melanoma inducido derivados de las líneas celulares B16F10 *wt* (colectados a los 7, 14 y 21 días post-aparición del tumor) y B16F10.DMH1 (colectados a los 7, 14, 21 y 28 días post-aparición del tumor).

Al llevar a cabo la comparación estadística dentro de cada grupo, se encontró que el porcentaje de las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> fueron disminuidas al día 14 e incrementadas al día 21 en bazos provenientes de ratones inoculados con B16F10 *wt* comparadas con el día 7, las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> no mostraron diferencia significativa en este grupo (\**p*<0.05) (Figura 26A y Tabla 9). En el grupo de bazos proveniente de ratones con melanoma inducidos con células B16F10.DMH1 se mostró un incremento significativo \**p*<0.05 de la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en una manera dependiente de tiempo a los 14, 21 y 28 días y las poblaciones de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> mostraron un incremento significativo en su porcentaje a los días 21 y 28 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) y 14, 21 y 28 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) (\**p*<0.05) (Figura 26B y Tabla 9).

Al realizar la comparación estadística entre grupos, solo se observó una diferencia significativa (\**p*<0.05) para la población celular de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, encontrando una disminución de la población en los días 7 y 21 y un incremento el día 14 en el grupo de ratones con tumor derivado de la línea celular B16F10 (Tabla 9).





**Figura 26. Evaluación de poblaciones celulares de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> en células de bazo durante el desarrollo de melanoma murino inducido con células B16F10 wt y B16F10.DMH1. A) Las células de bazo fueron colectadas durante el crecimiento del tumor (7, 14 y 21 días) en ratones inoculados con células B16F10 wt y B) a los 7, 14, 21 y 28 días post-aparición de tumor en ratones inoculados con células B16F10.DMH1 bajo condiciones de asepsia, posteriormente fueron aislados los linfocitos T provenientes de bazo mediante de separación magnética como es mencionado en métodos y posteriormente las poblaciones celulares fueron analizadas por citometría de flujo empleando el kit Mouse**



Regulatory T cell staining (PE-Cy5 Foxp3 FJK-16s, FITC CD4, PE CD25) eBioscience, USA. Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes. \* $p < 0.05$  indica la diferencia significativa dentro de cada grupo con respecto al día 7 durante el desarrollo del melanoma.

Análisis de poblaciones celulares (%)			
Días post-aparición de tumor	CD4 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup>
<b>B16F10 wt</b>			
7	14.35 ± 0.21	1.98 ± 0.01	0.32 ± 0.04
14	9.53 ± 0.10*	2.65 ± 0.23	0.15 ± 0.01*
21	18.51 ± 0.40*	2.52 ± 0.10	0.53 ± 0.01*
<b>B16F10.DMH1</b>			
7	9.29 ± 0.01 <sup>&amp;</sup>	2.04 ± 0.08	0.15 ± 0.08
14	13.35 ± 0.21* <sup>&amp;</sup>	2.2 ± 0.14	0.57 ± 0.08*
21	14.16 ± 0.16* <sup>&amp;</sup>	2.54 ± 0.06*	0.8 ± 0.07*
28	15.35 ± 0.21*	2.7 ± 0.14*	1.08 ± 0.08*

**Tabla 9. Porcentaje de poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> en células de bazo durante el desarrollo de melanoma murino inducido con células B16F10 wt y B16F10.DMH1.** Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes, \* $p < 0.05$  indica la diferencia significativa dentro de cada grupo durante el desarrollo del melanoma y <sup>&</sup> $p < 0.05$  indica la diferencia significativa entre los días del desarrollo tumoral de ambos grupos.



### 6.2.7 Correlación entre los días de crecimiento tumoral, *Foxp3*, IL-2, CD25<sup>+</sup> y peso tumoral en melanoma murino inducido con B16F10 *wt* y B16F10.DMH1

Se observó en tumores derivados de la línea celular B16F10 *wt* una correlación positiva entre el peso del tumor, la expresión de *Foxp3*, producción de IL-2 y expresión de CD25, los cuales fueron dependientes con el tiempo del crecimiento del tumor, excepto por la correlación de la producción de IL-2 con la expresión de CD25 al día 14 ( $r^2 = 0.832$ ) y la producción de IL-2 con el peso del tumor al día 21 ( $r^2 = 0.688$ ) (Tabla 10). Por otra parte en tumores derivados de la línea celular B16F10.DMH1, se observó una correlación positiva ( $r^2=1.000$ ) entre la expresión de *Foxp3*, CD25<sup>+</sup>, producción de IL-2 y peso del tumor, siendo dependientes con el tiempo del crecimiento del tumor. (Tabla 11).

7	14 Coeficiente de correlación				21 Coeficiente de correlación			
	Foxp3 Intrat.	IL-2	CD25	Peso de tumor	Foxp3 Intrat.	IL-2	CD25	Peso de tumor
Foxp3 Intrat.	0.998*	0.887	0.997*	0.998*	0.999*	0.870	0.998*	0.995
IL-2	0.893	1.00**	0.832	0.949	0.893	1.000**	0.982*	0.688*
CD25	0.998*	0.923*	0.982	0.997*	0.995*	0.951*	0.999*	0.915
Peso de tumor	0.999*	0.873	0.993*	0.982*	0.961*	0.870	0.998*	0.955*

**Tabla 10. Análisis de correlación entre los días de crecimiento tumoral, peso del tumor, expresión de *Foxp3*, C25 y producción de IL-2 durante el desarrollo de melanoma murino inducido con células B16F10 *wt*. Significancia \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$ .**



		7			
		Coeficiente de correlación			
		Foxp3 Intratumoral	IL-2	CD25	Peso de tumor
14 Coeficiente de correlación	Foxp3 Intratumoral	1.000**	0.995*	0.997*	1.000**
	IL-2	1.000**	1.000**	1.000**	1.000**
	CD25	1.000**	1.000**	1.000**	1.000**
	Peso de tumor	1.000**	1.000**	1.000**	1.000**
21 Coeficiente de correlación	Foxp3 Intratumoral	1.000**	1.000**	1.000**	0.999*
	IL-2	1.000**	1.000**	1.000**	1.000**
	CD25	1.000**	1.000**	1.000**	1.000**
	Peso de tumor	1.000**	0.993*	1.000**	1.000**
28 Coeficiente de correlación	Foxp3 Intratumoral	1.000**	1.000**	1.000**	1.000**
	IL-2	0.998*	1.000**	1.000**	1.000**
	CD25	1.000**	1.000**	1.000**	1.000**
	Peso de tumor	1.000**	1.000**	1.000**	1.000**

**Tabla 11.** *Análisis de correlación entre el peso del tumor, la expresión de Foxp3, producción de IL-2 y expresión de CD25 durante el desarrollo del melanoma murino inducido con células B16F10.DMH1. Significancia \*\* $p < 0.001$ .*



## DISCUSION

El melanoma es uno de los cánceres más agresivos y resistente a tratamientos de los cánceres humanos, es considerado inmunogénico pero evade exitosamente al sistema inmune diseminándose principalmente por la vía linfática, con gran capacidad de metástasis y regresión espontánea, por lo que el conocimiento de los mecanismos que ejercen las células tumorales dentro del tumor y en periferia, así como las células que participan en el mantenimiento de la homeostasis de la respuesta inmunológica en el cáncer, y sus mecanismos, es de gran interés debido a que delimitan la implementación de tratamientos efectivos y la identificación de apropiados blancos terapéuticos.

Se sabe en la actualidad que la expresión de *Foxp3* ha sido reportada en una variedad de tejido normal y canceroso fuera del linaje linfoide de las células Treg, con patrones opuestos de expresión. Por una parte, la expresión de *Foxp3* ha sido reportada en una variedad de epitelio y tejido normal de mama, próstata, ovario, y cerebro, y desregulada en células tumorales (Frattini *et al.*, 2012; Ladoire *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014; Zhang and Sun, 2010; Zuo *et al.*, 2007). Contrariamente, *Foxp3* ha sido reportada ser sobreexpresada en células de tumor de adenocarcinoma pancreático, melanoma, leucemia, carcinoma hepatocelular, carcinoma de riñón, tiroides y cáncer cervical (Ebert *et al.*, 2008; Hinz *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2014; Winerdal *et al.*, 2011). Esta aparente discrepancia podría ser explicada por una pérdida de la función oncosupresiva en tumores humanos debido a mutaciones o al contrario.

Nuestro trabajo se enfocó principalmente en determinar si *Foxp3* actuaba como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune tumoral *in vitro* e *in vivo*. Como primera parte de este trabajo fue primordial determinar si nuestra línea celular de melanoma murino (B16F10 *wt*) expresaba *Foxp3* debido a que no se encontraba



reportado en la literatura el análisis de su expresión. Para este propósito analizamos la expresión de Foxp3 en la línea celular de melanoma murino B16F10 *wt*, encontrando su expresión a nivel de RNA y proteína. Por lo que fue nuestro grupo de trabajo quien reporta por primera vez su expresión. Este dato de expresión de Foxp3 en la línea celular B16F10 *wt* concuerda con lo reportado por diversos investigadores (Hinz *et al.*, 2007, Ebert *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2010, Winerdal *et al.*, 2011, Cunha *et al.*, 2012 y Zeng *et al.*, 2013) quienes encuentran la expresión de Foxp3 en tejido normal, tejido canceroso y líneas celulares de cáncer, como adenocarcinoma pancreático, próstata, pulmón, cáncer colorectal, mama, melanoma, leucemia, carcinoma hepatocelular, cáncer de vejiga, carcinoma de tiroides, cáncer cervical y en tejido normal de mama, próstata, ovario y cerebro, fuera del linaje de células T reguladoras. Al analizar mediante inmunofluorescencia la expresión de Foxp3 en la línea de melanoma B16F10 encontramos que su expresión era particularmente a nivel perinuclear en la célula, correlacionando en parte con Winerdal y cols en el 2011., que reporta la presencia de la expresión de Foxp3 en tejidos de carcinoma de vejiga a nivel citoplásmica, nuclear y citoplásmica/nuclear, además no encuentra una correlación entre la expresión de Foxp3 y términos de sobrevivencia de los pacientes.

Estos resultados nos dieron la pauta para continuar con el trabajo experimental *in vitro* e *in vivo* el cual se basaría en el silenciamiento de la expresión de Foxp3 en la línea celular B16F10 *wt* y así tratar de dilucidar si la expresión de Foxp3 en la línea celular de melanoma murino actuaba como un posible mecanismo de evasión de la respuesta inmune tumoral *in vitro* e *in vivo* al inducir dos modelos de melanoma murino; uno inducido por la línea celular B16F10 *wt* y por otra parte la inducción de melanoma por la línea celular con silenciamiento de Foxp3.

Para llevar a cabo este objetivo se realizó el diseño y expresión de 5 construcciones de plásmidos recombinantes que codifican para RNAi contra Foxp3; de los cuales se realizó con éxito la caracterización de 3 plásmidos recombinantes diseñados (SiFoxp3-1, SiFoxp3-2 y SiFoxp3-3), y posteriormente se probó su efectividad en la línea celular B16F10 de melanoma murino.



*In vitro*, las 3 construcciones de RNAi (SiFoxp3-1, SiFoxp3-2 y SiFoxp3-3) redujeron de manera efectiva los niveles de expresión de Foxp3 y ésta disminución resultó en una reducción en la proliferación celular de la línea B16F10 *wt*, éstos resultados se contraponen con lo encontrado por Liu y cols en el 2009., en células epiteliales de próstata HPEC y Frattini y cols en el 2012., en células de glioblastoma, donde ambos observan que Foxp3 induce expresión de p21, el cuál actúa arrestando las células específicamente en fase G1 del ciclo celular y que una silenciamiento de Foxp3 induce un incremento en la proliferación y migración celular y tumorigénesis sugiriendo tener Foxp3 efecto sobre la regulación de p21. Un año más tarde (Ma *et al.*, 2013) de igual manera reporta que al silenciar la expresión de Foxp3 mediante RNA de interferencia en células de cáncer gástrico se reduce la expresión de genes proapoptóticos y hay un incremento de proliferación celular. Sugiriendo que Foxp3 endógeno podría actuar como un modulador positivo en vías apoptóticas. Fue hasta el 2013 donde Tan y cols, realizaron análisis de sobreexpresión de Foxp3 en líneas celulares de melanoma humano demostrando que se reducía notablemente la proliferación *in vitro*. Estos efectos antitumorales de Foxp3 en células de melanoma son consistentes con lo reportado en gliomas, mama, próstata y células de cáncer de ovario.

Estos datos anteriormente mencionados contraponen lo encontrado en nuestro trabajo, y puede deberse a que las líneas celulares independientemente del origen y/o especie llegan a presentar diferentes patrones de expresión de Foxp3, el cual puede desencadenar diferentes efectos sobre la proliferación celular, variar en análisis realizados *in vitro* e *in vivo*. Cabe mencionar que estudios del silenciamiento de Foxp3 en la línea celular B16F10 *wt* no han sido previamente reportados.

Después de determinar que el bajo porcentaje en el índice de proliferación celular en la línea de melanoma murino B16F10 se correlacionó positivamente con la expresión de Foxp3, seleccionamos el plásmido recombinante siFoxp3-1 para la generación de la línea celular con silenciamiento estable de Foxp3, debido a que éste plásmido redujo considerablemente la expresión de Foxp3, proliferación celular y además permitió el establecimiento de la línea con silenciamiento de Foxp3, la



cuál identificamos con el nombre de B16F10.DMH1. Los análisis de expresión de *Foxp3* permitieron corroborar que ésta línea celular derivada de las B16F10 *wt* tiene una menor expresión de *Foxp3*, y que el índice de proliferación durante una cinética de crecimiento es menor cuando se encuentra silenciado *Foxp3*.

Encontramos en sobrenadantes de la línea celular B16F10 *wt* la producción de citocinas IL-10, IL-2, TGF- $\beta$  e INF- $\gamma$ . Estos datos se correlacionan con los encontrados por Garcia de Galdeano y cols en 1996., donde concluyen que el sistema de señalización de IL-2 está presente en las células B16F10 y que la IL-2 favorece la proliferación celular en estas células, sugiriendo el papel de esta citocina en la actividad tumoral de esta línea celular. La producción de IL-10 en células de melanoma ha sido reportada por Itakura y cols en el., 2011 el cual cita que la producción de esta citocina actúa como un factor de crecimiento autócrino y podría estar relacionado con la capacidad de tumores primarios para proliferar, expandirse induciendo metástasis. La producción de TGF- $\beta$  es detectada previamente por Jin y cols en el 2013., en la línea de melanoma murino B16F10 *wt* el cual reporta que TGF- $\beta$  podría estar aumentando la agresividad de los carcinomas resistente a efectos inhibitorios de crecimiento, promoviendo a metástasis. Mientras que la producción de INF- $\gamma$  no había sido previamente reportada.

El siguiente aspecto considerado fue detectar si el silenciamiento de *Foxp3* modificaba *in vitro* la producción de citocinas en la línea celular de melanoma B16F10.DMH1, determinando que la producción de IL-2 es disminuida sin verse afectada la producción de IL-10 TGF- $\beta$  e INF- $\gamma$ . Debido a que estos resultados arrojan un posible efecto del silenciamiento de *Foxp3* sobre la producción de IL-2, analizamos la expresión de su receptor (CD25) encontrando que este receptor es expresado en las células B16F10 *wt* y su expresión es disminuida en las células B16F10.DMH1. Con los resultados mencionados anteriormente encontramos una correlación entre la expresión de *Foxp3* y la producción de IL-2, CD25 y proliferación de las células B16F10 *wt* y B16F10.DMH1 *in vitro*, sugiriendo que *Foxp3* participa en el crecimiento del tumor y en la modulación de IL-2 y CD25, lo





cuál pudiera tener un papel importante en la inmunosupresión de melanoma, posiblemente a través de esta vía.

El papel de *Foxp3* en células tumorales podría variar en diferentes tipos de tumor. Esta variación pudiera ser porque *Foxp3*, actuando como un factor de transcripción supresor, reprime diferentes blancos moleculares dependiendo del tipo celular, y a su vez pudiera estar regulando la expresión de gran cantidad de citocinas así como de sus receptores, tales como IL-2 y CD25 en las células B16F10, modulando así su señalización y por consiguiente la producción de ellas. Las citocinas juegan un papel importante en la inmunosupresión del cáncer ya que han sido identificadas durante el proceso de immunoedición del cáncer, tanto para disminuir la producción de otras moléculas que desempeñan un papel en el fortalecimiento de la inmunidad tumoral y en el incremento de otras que participan en la inmunosupresión, tales como IL-10, TGF- $\beta$  e IL-2 que tienen un papel importante en la generación de células Treg.

Una vez que realizamos el análisis del efecto del silenciamiento de *Foxp3* in vitro, pasamos a determinar el efecto de este silenciamiento en la inducción de modelos murinos, para ello se estableció un modelo murino inducido con las células B16F10 *wt* y un modelo murino inducido con las células B16F10.DMH1.

*In vivo*, encontramos que el tiempo de aparición de tumor fue al día 9 post-inoculación en el modelo murino inducido con B16F10 *wt* y al día 19 post-inoculación en el modelo murino inducido con células B16F10.DMH1, al analizar la supervivencia en ambos modelos murinos se demostró que es retardada en ratones inoculados con células B16F10.DMH1 en comparación con los ratones inoculados con células B16F10 *wt*. El peso de los tumores es incrementado durante el desarrollo tumoral en ambos modelos murinos de melanoma, sin embargo, los pesos de los tumores inducidos con las células B16F10.DMH1 fueron reducidos en comparación con los tumores inducidos por células B16F10 *wt*. Estos datos se correlacionan con los obtenidos in vitro donde el silenciamiento de *Foxp3* afecta la proliferación de la línea celular B16F10 *wt*, por lo que in vivo se retarda el tiempo de aparición tumoral



y la sobrevida. Al realizar análisis estadísticos encontramos que se presenta una correlación positiva en cuanto la expresión de Foxp3 con respecto a la aparición de tumor, peso del tumor y sobrevida durante el desarrollo tumoral al ser analizado en los modelos murino inducidos con B16F10 *wt* (7, 14 y 21 días post-aparición de tumor) y B16F10.DMH1 (7, 14, 21 y 28 días post-aparición de tumor).

Estos datos pueden explicarse con el hecho de que se sugiere que Foxp3 facilita la tumorigénesis capacitando a las células tumorales para evadir la inmunidad anti-tumor (Hinz *et al.*, 2007; Niu *et al.*, 2011). Esto ha sido demostrado en carcinoma pancreático y líneas celulares de melanoma, donde la expresión de Foxp3 inhibe la proliferación de células T en sistemas de cocultivos. La expresión de Foxp3 en los tumores también ha sido asociada con un mal pronóstico y baja sobrevida en pacientes con cáncer de mama, vejiga y pacientes con cáncer colorectal. Previos estudios han reportado la expresión de Foxp3 en melanoma metastásico y células derivadas de tumores (Ebert *et al.*, 2008), otros grupos de investigación subsecuentemente han reportado similares resultados (Niu *et al.*, 2011; Quaglino *et al.*, 2011). Niu y cols en el 2011., reportó que células de melanoma que expresan Foxp3 inhibieron la proliferación de células T activadas anti-CD3/anti-CD28 a través de la expresión inducida por Foxp3 de moléculas inhibitorias de células T en células de melanoma (B7-H1 y Fas ligando) y factores inmunosupresivos secretados (TGF- $\beta$ ), demostró una asociación entre la expresión de Foxp3 en melanomas primarios y desarrollo de metástasis visceral. Sin embargo si Foxp3 promueve o inhibe el crecimiento de las líneas celulares de melanoma no ha sido del todo dilucidado.

Una vez que observamos la expresión de Foxp3 como un posible mecanismo de evasión al modular producción de citocinas y expresión de moléculas involucradas en una respuesta inmune antitumor y determinamos que el silenciamiento de Foxp3 retarda la aparición del tumor así como la sobrevida en modelos murinos. Nuestro siguiente aspecto a considerar fue determinar la expresión de Foxp3 en los tumores inducidos y recolectados de ratones implantados con células B16F10 *wt* (7, 14 y 21



días post-aparición de tumor) y B16F10.DMH1 (7, 14, 21 y 28 días post-aparición de tumor), cabe mencionar que se eligieron estos días debido a que los ratones implantados con las células B16F10 *wt* presentaron una sobrevida promedio de 39 días post-inoculación del tumor, mientras que los ratones inoculados con las células B16F10.DMH1 sobrevivieron hasta el día 51 post-inoculación del tumor. Los resultados indicaron que la expresión de *Foxp3* a nivel de RNAm y proteína en los tumores se ve incrementada durante el desarrollo tumoral en el modelo de melanoma murino inducido con B16F10 *wt*, mientras que la expresión de *Foxp3* se incrementa hasta el día 28 post-aparición del tumor en los tumores inducidos con B16F10.DMH1, estos resultados concuerdan con la expresión de la proteína en ambos casos. Al hacer una comparación entre la expresión de *Foxp3* de los tumores inducidos con B16F10 *wt* y B16F10.DMH1 se puede observar una disminución significativa en la expresión de *Foxp3* en los tumores inducidos con células B16F10.DMH1, estos datos nuevamente corroboran la participación de *Foxp3* durante el desarrollo tumoral por Tan y cols en el 2013., quien reporta su expresión en gran cantidad de tumores incluyendo melanoma suponiendo que la función inmunosupresiva de *Foxp3* podría contribuir a la progresión del cáncer.

Sin embargo hay que tomar en cuenta que dentro de los tumores existen una gran variedad de células del sistema inmune y factores solubles cuya primordial función es eliminar a las células de tumor, de igual manera se ha visto la presencia de linfocitos infiltrantes de tumor con un fenotipo regulador  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  lo cuál ha sido reportado por una amplia cantidad de trabajos de investigación en diferentes tipos de cáncer. Las Treg desempeñan funciones inmunosupresivas que han sido estudiadas en las últimas dos décadas. Desempeñan un papel primordial en resolución de inflamación y restauración de la homeostasis inmunológica (Wang *et al.*, 2014). Sin embargo, a pesar de estas funciones, existen grandes evidencias donde sugieren que las Treg son acumuladas en diversos tipos de carcinomas (Lee *et al.*, 2011; Ormandy *et al.*, 2005). Y que esta presencia de poblaciones ha sido asociada con peor pronóstico y bajo índice de sobrevivencia, esto agravándose más proviniendo de los tumores (Tregs intratumorales). Por lo que la depleción de Treg



intratumorales resultará en una potente respuesta inmune anti-tumor (Chaput et al., 2009; Chen et al., 2012; Wang et al., 2013). En melanoma se ha reportado un alto impacto de los linfocitos en general que infiltran los tumores, arrojando resultados controversiales de estas células T, al actuar como mecanismos de evasión de la respuesta inmune antitumor o actuando como un factor pronóstico favorable (Ladányi, 2013). Debido a lo anteriormente descrito y que la presencia de linfocitos infiltrantes de tumor y Treg (CD4+CD25+FOXP3+) infiltrantes pudiera influenciar la expresión de *Foxp3* tumoral, planteamos aislar los linfocitos infiltrantes de tumor y posteriormente evaluamos la expresión de *Foxp3* en las células tumorales, encontrando el mismo comportamiento de expresión durante el desarrollo tumoral en las células B16F10 *wt* intratumorales, mientras que en las células B16F10.DMH1 intratumorales se mostró una expresión de *Foxp3* baja durante los días de desarrollo tumoral comparadas con las células B16F10 *wt* intratumorales a los 7, 14 y 21 días, sin embargo esta expresión se incrementó al día 28 post-aparición de tumor. Esto pudiera deberse al efecto que ejerce el microambiente a las células de tumor. El microambiente es definido como un sistema complejo en el cual se involucran una gran cantidad de células, las cuales participan directa o indirectamente en la progresión del tumor, estas células, vasos, y moléculas presentes alrededor del tumor influyen al desarrollo de las células tumorales, adquiriendo éstas una mayor malignidad, algunos de los componentes involucrados en el microambiente tumoral pueden ser agrupados en 4 categorías; células cancerosas, no cancerosas, factores solubles secretados y material sólido no celular entre los que se incluye matriz extracelular. Muchos de estos factores contribuyendo al escape tumoral entre los que se destaca principalmente la producción de factores solubles conocidos como citocinas (Chen *et al.*, 2005; Gorelik and Flavell, 2001; Zhang *et al.*, 2005), estos datos concuerdan con Franzke y cols en el 2006., quien especifica que los tumores podrían bloquear la generación de inmunidad tumoral específica de antígenos por la liberación de moléculas con actividad biológica, como por ejemplo citocinas o antígenos que incrementan el número de poblaciones celulares haciendo que se incrementen en la circulación linfática o periférica. Betts y cols en el 2006.,



reporta que los tipos de células inmunes y sus funciones óptimas para controlar el crecimiento del tumor *in vivo* no han sido completamente identificados.

Debido a lo anteriormente mencionado pudiéramos pensar que citocinas como IL-2 que hemos visto en nuestros resultados se incrementa durante el desarrollo tumoral tanto en tumores inducidos por células B16F10 *wt* y B16F10.DMH1 pudiera estar influenciando a la sobreexpresión de *Foxp3* en estas células intratumorales, estos datos concuerdan con lo reportado por García de Galdeano y cols en 1996., quien encuentra la expresión del RNAm de IL-2 y su receptor en las células B16F10 *wt* y que la administración de IL-2 recombinante se incrementa la proliferación celular sugiriendo un papel de esta citocina en la actividad tumoral de estas células.

Tomando en cuenta que IL-2 esta presente en el microambiente tumoral, es producido por las células T efectoras durante las respuesta inmune antitumor , actúa de manera autócrina para la proliferación de células T y de manera paracrina para el cambio de fenotipo efector CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> a un fenotipo Treg CD<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> y participando en la proliferación de estas células (Ahmadzadeh *et al.*, 2007), suponemos que IL-2 juega un papel primordial en la sobreexpresión de *Foxp3* en las células tumorales, como lo hace en el linaje linfoide.

Continuando con la secuencia de nuestro trabajo y después de observar la producción de IL-2 en tumores inducidos por células B16F10 *wt* y B16F10.DMH1 respectivamente y que existe una correlación con la expresión de *Foxp3* y peso tumoral durante el desarrollo del tumor. Analizamos la expresión del receptor de IL-2 (CD25) para determinar si el mecanismo por el cuál la sobreexpresión de *Foxp3* en las células de tumor intratumorales es a través de IL-2 y su receptor (CD25). Encontrando que la expresión de CD25 es incrementada durante el desarrollo tumoral en las células B16F10 *wt* intratumorales, mientras que en las células B16F10.DMH1 se observa un comportamiento similar con la expresión de *Foxp3*, donde es roto el equilibrio hasta el día 28. Por lo que de igual manera suponemos que existe un mayor desequilibrio en la homeostasis tumoral como sucede en la fase de escape durante la inmunoedición del cáncer (Betts *et al.*, 2006) y que el



microambiente tumoral ejerce mayores influencias negativas que modifican tanto la expresión de *Foxp3* y CD25 dándole mayor agresividad a estas células de tumor.

Se tienen antecedentes que muchos tipos de células de cáncer expresan el receptor de IL-2 (IL-2R); sin embargo, se tienen pocas publicaciones sobre el posible papel de su receptor. Se conoce que células de cáncer cervical no solo expresan el receptor de IL-2, si no que producen y secretan IL-2. Se ha mostrado que empleando anticuerpos anti-IL-2R, la proliferación de estas células es inhibida, sugiriendo que las células adquieren una dependencia parcial sobre este factor para su proliferación. Se hipotetiza que las propiedades adquiridas por las células tumorales para usar IL-2 para su propia proliferación podría resultar en un mecanismo de competición con linfocitos para este factor de crecimiento. En consecuencia, se supone que el uso de IL-2 por las células tumorales eliminaría esta citocina en el sitio del tumor, siendo este un factor de crecimiento necesario para la actividad citotóxica de linfocitos infiltrantes de tumor (Rangel-Corona *et al.*, 2010).

Debido a que hemos observado que muchos de los mecanismos ejercidos por los linfocitos T para inducir una respuesta inmune antitumor efectiva son similares a los mecanismos que usan las propias células de tumor para su crecimiento. Quisimos determinar si la expresión de *Foxp3* en las células tumorales B16F10 modula la expresión de poblaciones celulares (linfocitos T CD4<sup>+</sup>) o si llega a tener la capacidad de inducir el cambio de células efectoras (linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> a un tipo regulador (linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>), todo esto al ser analizado en linfocitos infiltrantes de tumor o linfocitos provenientes de bazo.

Encontramos que existe un incremento de las poblaciones de linfocitos T (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) en una manera dependiente del tiempo, peso del tumor y expresión de *Foxp3* durante el desarrollo del melanoma (7, 14 y 21 días) inducido por células B16F10 *wt*, lo cual se puede explicar con el hecho de que los linfocitos infiltrantes de tumor incrementa su capacidad de activar a los linfocitos T adquiriendo el fenotipo (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) para así ejercer sus funciones supresoras sobre las células tumorales, como un mecanismo de respuesta inmune antitumor, sin embargo al analizar los linfocitos T infiltrantes de tumor CD<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> inducidos con la línea



celular B16F10.DMH1 observamos que solo existe un ligero incremento en esta población al día 14 por lo que estos resultados nos dan la pauta a pensar que la expresión de Foxp3 en las células tumorales no posee algún efecto sobre las poblaciones de linfocitos efectores infiltrantes de tumor ( $CD4^+CD25^+$ ). El análisis de poblaciones Treg infiltrantes de tumor ( $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ ) también se ve incrementado de una manera dependiente de tiempo y peso de tumores inducidos con las células B16F10 *wt*, mientras que al analizar la expresión de esta población celular en los TILs de tumores inducidos por B16F10.DMH1 se observa un incremento hasta el día 28, lo cual al compararlo con la expresión de Foxp3 en la línea B16F10.DMH1 intratumoral de igual manera se ve incrementado hasta el día 28. Al realizar la comparación entre los 2 grupos de tumores (inducidos por B16F10 *wt* y B16F10.DMH1 respectivamente) durante el desarrollo tumoral, observamos que es menor el porcentaje de expresión de la población celular  $CD4^+CD2^+FOXP3^+$  en los TILs inducidos por células B16F10.DMH1. Estos datos podrían suponer un posible papel de la expresión de Foxp3 en las células de tumor sobre el fenotipo de linfocitos T reguladores ( $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ ) infiltrantes de tumor. Las poblaciones de TILs  $CD4^+$  se encuentran presentes en tumores inducidos con ambas líneas celulares, sin observarse un cambio relevante en su expresión. En la actualidad no existen reportes de la posible correlación de expresión de Foxp3 en células tumorales y poblaciones celulares.

Determinamos la expresión de estas mismas poblaciones celulares en linfocitos T provenientes de bazo de ratones con melanoma inducido con células B16F10 *wt* y B16F10.DMH1, esto para tratar de dilucidar si la expresión de Foxp3 en las células tumorales podría inducir un cambio en las poblaciones celulares en periferia, encontrando; que las poblaciones de linfocitos T  $CD4^+$  y  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  en células de bazo disminuyen al día 14, e incrementan al día 21 del desarrollo tumoral en el modelo murino inducido con células B16F10 *wt*, sin verse afectada la expresión de linfocitos T  $CD4^+CD25^+$ . Esta baja y alta en cuanto a la expresión de estas poblaciones en ambos casos puede deberse a que los linfocitos T que están infiltrando el bazo, pudieron estar en contacto con antígenos u otras moléculas como



citocinas presentes en periferia que modularan la expresión de estas poblaciones celulares actuando como una forma de supresión de ciertos antígenos hacia los linfocitos T para evadir la respuesta inmunológica y así desencadenando una serie de influencias negativas que a la vez alertan al propio sistema inmune por lo que un incremento tanto de  $CD4^+$  y  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  es observado como una forma de lucha por la homeostasis y supresión del tumor o la lucha en contra la presencia de otros antígenos que pudieran estar presentes en los modelos murinos al estar pasando por un estado de inmunosupresión dada por el tumor, tomando en cuenta que las células T reguladoras no solamente tienen participación en la patogénesis del tumor proveyendo a los tumores mecanismos para evadir la detección y destrucción por el sistema inmune, tanto en la inducción o reclutamiento de células T reg, si no que también son uno de los mecanismos alternativos de mantenimiento de la tolerancia periférica controlando la inmunidad autoreactiva efectora y la inmunidad hacia organismos y moléculas extrañas (Buckner and Ziegler, 2004; Knutson *et al.*, 2007; Kronenberg and Rudensky, 2005; Redmond and Sherman, 2005). Al realizar una comparación entre los resultados obtenidos con las células de bazo de ratones con melanoma inducido por B16F10 *wt* y B16F10.DMH1 pudimos observar que es menor la expresión de  $CD4^+$  en las células de bazo de ratones con tumor inducido con B16F10.DMH1 a los días 7, y 21, mientras que al día 14 se observa un incremento, no siendo afectadas las células  $CD4^+CD25^+$  y  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ , esto arrojando la hipótesis de que estas poblaciones celulares en células de bazo no se ven afectadas por la expresión de *Foxp3* presente en las células tumorales.





## CONCLUSIONES

1. La línea celular de melanoma murino B16F10 *wt* expresa *Foxp3* a nivel de RNAm y proteína, encontrando su expresión a nivel perinuclear, y el tratamiento con los RNAi específicos de *Foxp3* disminuyen la viabilidad y proliferación celular.
2. La línea B16F10 *wt* tiene la capacidad de producir IL-10, TGF- $\beta$ , INF- $\gamma$  e IL-2 en alta concentración y expresión del receptor CD25 *in vitro*.
3. Se estableció una línea celular de melanoma murino con silenciamiento de *Foxp3* identificada como B16F10.DMH1, la cuál posee menor índice de proliferación celular, correlacionándose con la producción de IL-2 y su receptor CD25.
4. *In vivo*, el silenciamiento de *Foxp3* en las células B16F10.DMH1 afecta el crecimiento del melanoma murino incrementando el tiempo de aparición del tumor, sobrevida y disminuyendo el peso tumoral.
5. Existe una correlación positiva entre *Foxp3*, CD25, IL-2 e IL-10 y negativa con la producción de IFN- $\gamma$  durante el desarrollo del melanoma murino.
6. *Foxp3* intratumoral, está correlacionado con la expresión y presencia de células T reguladoras con fenotipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> en el microambiente tumoral y una disminución de células T CD4<sup>+</sup> a nivel periférico, sin afectar a las otras poblaciones celulares evaluadas.

El factor de transcripción *Foxp3*, participa en el desarrollo de la tumorigénesis en melanoma murino *in vitro* e *in vivo*, con la capacidad de modular a citocinas y moléculas involucradas en el desarrollo tumoral así como a poblaciones celulares con fenotipo regulador en el tumor, pero no en periferia.



## **LITERATURA CITADA**

1. Abad, C., Tan, Y.-V., Lopez, R., Nobuta, H., Dong, H., Phan, P., Feng, J.-M., Campagnoni, A.T., Waschek, J.A., 2010. Vasoactive intestinal peptide loss leads to impaired CNS parenchymal T-cell infiltration and resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 19555–19560.
2. Agnello, D., Lankford, C.S.R., Bream, J., Morinobu, A., Gadina, M., O'Shea, J.J., Frucht, D.M., 2003. Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J. Clin. Immunol.* 23, 147–161.
3. Ahmadzadeh, M., Antony, P.A., Rosenberg, S.A., 2007. IL-2 and IL-15 each mediate de novo induction of FOXP3 expression in human tumor antigen-specific CD8 T cells. *J. Immunother. Hagerstown Md* 1997 30, 294–302.
4. Akslen, L.A., Naumov, G.N., 2008. Tumor dormancy--from basic mechanisms to clinical practice. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 116, 545–547.
5. Baecher-Allan, C., Brown, J.A., Freeman, G.J., Hafler, D.A., 2001. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory cells in human peripheral blood. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 167, 1245–1253.
6. Bensinger, S.J., Walsh, P.T., Zhang, J., Carroll, M., Parsons, R., Rathmell, J.C., Thompson, C.B., Burchill, M.A., Farrar, M.A., Turka, L.A., 2004. Distinct IL-2 receptor signaling pattern in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 172, 5287–5296.
7. Betts, G.J., Clarke, S.L., Richards, H.E., Godkin, A.J., Gallimore, A.M., 2006. Regulating the immune response to tumours. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58, 948–961.
8. Boyman, O., Sprent, J., 2012. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 180–190.
9. Brown, T.J., Lioubin, M.N., Marquardt, H., 1987. Purification and



- characterization of cytostatic lymphokines produced by activated human T lymphocytes. Synergistic antiproliferative activity of transforming growth factor beta 1, interferon-gamma, and oncostatin M for human melanoma cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 139, 2977–2983.
10. Buckner, J.H., Ziegler, S.F., 2004. Regulating the immune system: the induction of regulatory T cells in the periphery. *Arthritis Res. Ther.* 6, 215–222.
  11. BURNET, M., 1957. Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *Br. Med. J.* 1, 841–847.
  12. Campoli, M., Chang, C.-C., Ferrone, S., 2002. HLA class I antigen loss, tumor immune escape and immune selection. *Vaccine* 20 Suppl 4, A40–45.
  13. Cesana, G.C., DeRaffele, G., Cohen, S., Moroziewicz, D., Mitcham, J., Stoutenburg, J., Cheung, K., Hesdorffer, C., Kim-Schulze, S., Kaufman, H.L., 2006. Characterization of CD4+CD25+ regulatory T cells in patients treated with high-dose interleukin-2 for metastatic melanoma or renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 24, 1169–1177.
  14. Chen, M.-L., Pittet, M.J., Gorelik, L., Flavell, R.A., Weissleder, R., von Boehmer, H., Khazaie, K., 2005. Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 419–424.
  15. Chen, W., Wahl, S.M., 2003. TGF-beta: the missing link in CD4+CD25+ regulatory T cell-mediated immunosuppression. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14, 85–89.
  16. Cho, E., Rosner, B.A., Feskanich, D., Colditz, G.A., 2005. Risk factors and individual probabilities of melanoma for whites. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 23, 2669–2675.
  17. Couper, K.N., Blount, D.G., Riley, E.M., 2008. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 180, 5771–5777.
  18. Derré, L., Corvaisier, M., Charreau, B., Moreau, A., Godefroy, E., Moreau-Aubry, A., Jotereau, F., Gervois, N., 2006. Expression and release of HLA-E



- by melanoma cells and melanocytes: potential impact on the response of cytotoxic effector cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 177, 3100–3107.
19. Dieckmann, D., Bruett, C.H., Ploettner, H., Lutz, M.B., Schuler, G., 2002. Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *J. Exp. Med.* 196, 247–253.
20. Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T., Schuler, G., 2001. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J. Exp. Med.* 193, 1303–1310.
21. Dimitrakopoulos, F.-I.D., Papadaki, H., Antonacopoulou, A.G., Kottorou, A., Gotsis, A.D., Scopa, C., Kalofonos, H.P., Mouzaki, A., 2011. Association of FOXP3 expression with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 31, 1677–1683.
22. Dong, H., Strome, S.E., Salomao, D.R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D.B., Roche, P.C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., Lennon, V.A., Celis, E., Chen, L., 2002. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.* 8, 793–800.
23. Douglass, S., Ali, S., Meeson, A.P., Browell, D., Kirby, J.A., 2012. The role of FOXP3 in the development and metastatic spread of breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 31, 843–854.
24. Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., Schreiber, R.D., 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 3, 991–998.
25. Dunn, G.P., Old, L.J., Schreiber, R.D., 2004. The three Es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 329–360.
26. Ebert, L.M., Tan, B.S., Browning, J., Svobodova, S., Russell, S.E., Kirkpatrick, N., Gedye, C., Moss, D., Ng, S.P., MacGregor, D., Davis, I.D., Cebon, J., Chen, W., 2008. The regulatory T cell-associated transcription factor FoxP3 is expressed by tumor cells. *Cancer Res.* 68, 3001–3009.
27. Ferradini, L., Mackensen, A., Genevée, C., Bosq, J., Duvillard, P., Avril, M.F., Hercend, T., 1993. Analysis of T cell receptor variability in tumor-



- infiltrating lymphocytes from a human regressive melanoma. Evidence for in situ T cell clonal expansion. *J. Clin. Invest.* 91, 1183–1190.
28. Fonseca-Camarillo, G., Furuzawa-Carballeda, J., Martínez-Benítez, B., Barreto-Zúñiga, R., Yamamoto-Furusho, K., 2011. [Intelukin-10 expression with immunoregulatory function in the mucosa of patients with ulcerative colitis]. *Rev. Gastroenterol. México* 76, 113–119.
29. Fontenot, J.D., Gavin, M.A., Rudensky, A.Y., 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4, 330–336.
30. Franzke, A., Hunger, J.K., Dittmar, K.E.J., Ganser, A., Buer, J., 2006. Regulatory T-cells in the control of immunological diseases. *Ann. Hematol.* 85, 747–758.
31. García de Galdeano, A., Boyano, M.D., Smith-Zubiaga, I., Cañavate, M.L., 1996. B16F10 murine melanoma cells express interleukin-2 and a functional interleukin-2 receptor. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 17, 155–167.
32. González Parias, J.L., Duque Giraldo, V.E., Velásquez-Lopera, M.M., 2010. FOXP3: Controlador maestro de la generación y función de las células reguladoras naturales. *Inmunología* 29, 74–84.
33. Gorelik, L., Flavell, R.A., 2001. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat. Med.* 7, 1118–1122.
34. Grandics, P., 2006. Complete remission achieved in a case of both primary and recurrent adult acute myelogeneous leukemia by a novel nutritional therapy. *J. Altern. Complement. Med. N. Y.* N 12, 311–315.
35. Greenwald, P., Dunn, B.K., 2009. Landmarks in the history of cancer epidemiology. *Cancer Res.* 69, 2151–2162.
36. Harvey, K., Tapon, N., 2007. The Salvador-Warts-Hippo pathway - an emerging tumour-suppressor network. *Nat. Rev. Cancer* 7, 182–191.
37. Herlyn, M., Guerry, D., Koprowski, H., 1985. Recombinant gamma-interferon induces changes in expression and shedding of antigens associated



- with normal human melanocytes, nevus cells, and primary and metastatic melanoma cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 134, 4226–4230.
38. Hinz, S., Pagerols-Raluy, L., Oberg, H.-H., Ammerpohl, O., Grüssel, S., Sipos, B., Grützmann, R., Pilarsky, C., Ungefroren, H., Saeger, H.-D., Klöppel, G., Kabelitz, D., Kalthoff, H., 2007. Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer. *Cancer Res.* 67, 8344–8350.
39. Huehn, J., Siegmund, K., Lehmann, J.C.U., Siewert, C., Haubold, U., Feuerer, M., Debes, G.F., Lauber, J., Frey, O., Przybylski, G.K., Niesner, U., de la Rosa, M., Schmidt, C.A., Bräuer, R., Buer, J., Scheffold, A., Hamann, A., 2004. Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 199, 303–313.
40. Itakura, E., Huang, R.-R., Wen, D.-R., Paul, E., Wünsch, P.H., Cochran, A.J., 2011. IL-10 expression by primary tumor cells correlates with melanoma progression from radial to vertical growth phase and development of metastatic competence. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 24, 801–809.
41. Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J., Enk, A.H., 2000. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 192, 1213–1222.
42. Karanikas, V., Speletas, M., Zamanakou, M., Kalala, F., Loules, G., Kerenidi, T., Barda, A.K., Gourgoulisanis, K.I., Germenis, A.E., 2008. Foxp3 expression in human cancer cells. *J. Transl. Med.* 6, 19.
43. Kataoka, T., Schröter, M., Hahne, M., Schneider, P., Irmeler, M., Thome, M., Froelich, C.J., Tschopp, J., 1998. FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 161, 3936–3942.
44. Kelly, J.W., Sagebiel, R.W., Blois, M.S., 1985. Regression in malignant melanoma. A histologic feature without independent prognostic significance.



Cancer 56, 2287–2291.

45. Knutson, K.L., Disis, M.L., Salazar, L.G., 2007. CD4 regulatory T cells in human cancer pathogenesis. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 56, 271–285.
46. Koebel, C.M., Vermi, W., Swann, J.B., Zerafa, N., Rodig, S.J., Old, L.J., Smyth, M.J., Schreiber, R.D., 2007. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 450, 903–907.
47. Kortylewski, M., Komyod, W., Kauffmann, M.-E., Bosserhoff, A., Heinrich, P.C., Behrmann, I., 2004. Interferon-gamma-mediated growth regulation of melanoma cells: involvement of STAT1-dependent and STAT1-independent signals. *J. Invest. Dermatol.* 122, 414–422.
48. Kronenberg, M., Rudensky, A., 2005. Regulation of immunity by self-reactive T cells. *Nature* 435, 598–604.
49. Ladoire, S., Arnould, L., Mignot, G., Coudert, B., Rébé, C., Chalmin, F., Vincent, J., Bruchard, M., Chauffert, B., Martin, F., Fumoleau, P., Ghiringhelli, F., 2011a. Presence of Foxp3 expression in tumor cells predicts better survival in HER2-overexpressing breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res. Treat.* 125, 65–72.
50. Ladoire, S., Martin, F., Ghiringhelli, F., 2011b. Prognostic role of FOXP3+ regulatory T cells infiltrating human carcinomas: the paradox of colorectal cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 60, 909–918.
51. Lal, G., Bromberg, J.S., 2009. Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression. *Blood* 114, 3727–3735.
52. Lan, R.Y., Mackay, I.R., Gershwin, M.E., 2007. Regulatory T cells in the prevention of mucosal inflammatory diseases: patrolling the border. *J. Autoimmun.* 29, 272–280.
53. Lan, R.Y., Selmi, C., Gershwin, M.E., 2008. The regulatory, inflammatory, and T cell programming roles of interleukin-2 (IL-2). *J. Autoimmun.* 31, 7–12.
54. Levings, M.K., Sangregorio, R., Roncarolo, M.G., 2001. Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J. Exp.*



Med. 193, 1295–1302.

55. Li, W., Wang, L., Katoh, H., Liu, R., Zheng, P., Liu, Y., 2011. Identification of a tumor suppressor relay between the FOXP3 and the Hippo pathways in breast and prostate cancers. *Cancer Res.* 71, 2162–2171.
56. Liu, R., Wang, L., Chen, G., Katoh, H., Chen, C., Liu, Y., Zheng, P., 2009. FOXP3 up-regulates p21 expression by site-specific inhibition of histone deacetylase 2/histone deacetylase 4 association to the locus. *Cancer Res.* 69, 2252–2259.
57. Loser, K., Hansen, W., Apelt, J., Balkow, S., Buer, J., Beissert, S., 2005. In vitro-generated regulatory T cells induced by Foxp3-retrovirus infection control murine contact allergy and systemic autoimmunity. *Gene Ther.* 12, 1294–1304.
58. Malek, T.R., 2008. The biology of interleukin-2. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 453–479.
59. Malek, T.R., Bayer, A.L., 2004. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 665–674.
60. McInnes, N., Sadlon, T.J., Brown, C.Y., Pederson, S., Beyer, M., Schultze, J.L., McColl, S., Goodall, G.J., Barry, S.C., 2012. FOXP3 and FOXP3-regulated microRNAs suppress SATB1 in breast cancer cells. *Oncogene* 31, 1045–1054.
61. McKallip, R., Li, R., Ladisch, S., 1999. Tumor gangliosides inhibit the tumor-specific immune response. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 163, 3718–3726.
62. Mellor, A.L., Munn, D.H., 2008. Creating immune privilege: active local suppression that benefits friends, but protects foes. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 74–80.
63. Mocellin, S., Marincola, F.M., Young, H.A., 2005. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *J. Leukoc. Biol.* 78, 1043–1051.
64. Munn, D.H., Mellor, A.L., 2007. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J. Clin. Invest.* 117, 1147–1154.





65. Nair, S., Boczkowski, D., Fassnacht, M., Pisetsky, D., Gilboa, E., 2007. Vaccination against the forkhead family transcription factor Foxp3 enhances tumor immunity. *Cancer Res.* 67, 371–380.
66. O’Gorman, W.E., Dooms, H., Thorne, S.H., Kuswanto, W.F., Simonds, E.F., Krutzik, P.O., Nolan, G.P., Abbas, A.K., 2009. The initial phase of an immune response functions to activate regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 332–339.
67. Ormandy, L.A., Hillemann, T., Wedemeyer, H., Manns, M.P., Greten, T.F., Korangy, F., 2005. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 65, 2457–2464.
68. Quaglino, P., Osella-Abate, S., Marengo, F., Nardò, T., Gado, C., Novelli, M., Savoia, P., Bernengo, M.G., 2011. FoxP3 expression on melanoma cells is related to early visceral spreading in melanoma patients treated by electrochemotherapy. *Pigment Cell Melanoma Res.* 24, 734–736.
69. Rabinovich, A., Medina, L., Piura, B., Huleihel, M., 2010. Expression of IL-10 in human normal and cancerous ovarian tissues and cells. *Eur. Cytokine Netw.* 21, 122–128.
70. Ramana, C.V., Gil, M.P., Han, Y., Ransohoff, R.M., Schreiber, R.D., Stark, G.R., 2001. Stat1-independent regulation of gene expression in response to IFN-gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 6674–6679.
71. Rangel-Corona, R., Corona-Ortega, T., Soto-Cruz, I., López-Labra, A., Pablo-Arcos, T., Torres-Guarneros, C.F., Weiss-Steider, B., 2010. Evidence that cervical cancer cells secrete IL-2, which becomes an autocrine growth factor. *Cytokine* 50, 273–277.
72. Redmond, W.L., Sherman, L.A., 2005. Peripheral tolerance of CD8 T lymphocytes. *Immunity* 22, 275–284.
73. Schiller, J.H., Pugh, M., Kirkwood, J.M., Karp, D., Larson, M., Borden, E., 1996. Eastern cooperative group trial of interferon gamma in metastatic melanoma: an innovative study design. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2, 29–36.
74. Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., Hume, D.A., 2004. Interferon-



- gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75, 163–189.
75. Schwartz, R.H., 2003. T cell anergy. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 305–334.
76. Seddon, B., Mason, D., 2000. The third function of the thymus. *Immunol. Today* 21, 95–99.
77. Seliger, B., Ruiz-Cabello, F., Garrido, F., 2008. IFN inducibility of major histocompatibility antigens in tumors. *Adv. Cancer Res.* 101, 249–276.
78. Seoane, J., 2006. Escaping from the TGFbeta anti-proliferative control. *Carcinogenesis* 27, 2148–2156.
79. Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., Sakaguchi, S., 2005. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J. Exp. Med.* 201, 723–735.
80. Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., Schreiber, R.D., 2001. IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107–1111.
81. Shin, M.S., Kim, H.S., Lee, S.H., Park, W.S., Kim, S.Y., Park, J.Y., Lee, J.H., Lee, S.K., Lee, S.N., Jung, S.S., Han, J.Y., Kim, H., Lee, J.Y., Yoo, N.J., 2001. Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers. *Cancer Res.* 61, 4942–4946.
82. Smith, E.L., Finney, H.M., Nesbitt, A.M., Ramsdell, F., Robinson, M.K., 2006. Splice variants of human FOXP3 are functional inhibitors of human CD4+ T-cell activation. *Immunology* 119, 203–211.
83. Stassen, M., Fondel, S., Bopp, T., Richter, C., Müller, C., Kubach, J., Becker, C., Knop, J., Enk, A.H., Schmitt, S., Schmitt, E., Jonuleit, H., 2004. Human CD25+ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins alpha 4 beta 7 or alpha 4 beta 1 confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells. *Eur. J. Immunol.* 34, 1303–1311.
84. Swann, J.B., Smyth, M.J., 2007. Immune surveillance of tumors. *J. Clin. Invest.* 117, 1137–1146.



85. Takahashi, H., Feuerhake, F., Kutok, J.L., Monti, S., Dal Cin, P., Neuberg, D., Aster, J.C., Shipp, M.A., 2006. FAS death domain deletions and cellular FADD-like interleukin 1beta converting enzyme inhibitory protein (long) overexpression: alternative mechanisms for deregulating the extrinsic apoptotic pathway in diffuse large B-cell lymphoma subtypes. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 12, 3265–3271.
86. Takimoto, T., Wakabayashi, Y., Sekiya, T., Inoue, N., Morita, R., Ichiyama, K., Takahashi, R., Asakawa, M., Muto, G., Mori, T., Hasegawa, E., Saika, S., Shizuya, S., Hara, T., Nomura, M., Yoshimura, A., 2010. Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the TGF-beta-mediated regulation of regulatory T plasticity and Th1 development. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185, 842–855.
87. Terabe, M., Berzofsky, J.A., 2004. Immunoregulatory T cells in tumor immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 16, 157–162.
88. Thorstenson, K.M., Khoruts, A., 2001. Generation of anergic and potentially immunoregulatory CD25+CD4 T cells in vivo after induction of peripheral tolerance with intravenous or oral antigen. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167, 188–195.
89. Tripathi, P., Agrawal, S., 2006. Non-classical HLA-G antigen and its role in the cancer progression. *Cancer Invest.* 24, 178–186.
90. Viguier, M., Lemaître, F., Verola, O., Cho, M.-S., Gorochoy, G., Dubertret, L., Bachelez, H., Kourilsky, P., Ferradini, L., 2004. Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 173, 1444–1453.
91. Vlad, G., Cortesini, R., Suciu-Foca, N., 2005. License to heal: bidirectional interaction of antigen-specific regulatory T cells and tolerogenic APC. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 5907–5914.
92. Wang, L., Liu, R., Li, W., Chen, C., Katoh, H., Chen, G.-Y., McNally, B., Lin, L., Zhou, P., Zuo, T., Cooney, K.A., Liu, Y., Zheng, P., 2009. Somatic single hits inactivate the X-linked tumor suppressor FOXP3 in the prostate.



- Cancer Cell 16, 336–346.
93. Wang, L.-H., Su, L., Wang, J.-T., 2010. Correlation between elevated FOXP3 expression and increased lymph node metastasis of gastric cancer. *Chin. Med. J. (Engl.)* 123, 3545–3549.
  94. Whiteside, T.L., 2014. Regulatory T cell subsets in human cancer: are they regulating for or against tumor progression? *Cancer Immunol. Immunother.* CII 63, 67–72.
  95. Winerdal, M.E., Marits, P., Winerdal, M., Hasan, M., Rosenblatt, R., Tolf, A., Selling, K., Sherif, A., Winqvist, O., 2011. FOXP3 and survival in urinary bladder cancer. *BJU Int.* 108, 1672–1678.
  96. Wolf, A.M., Rumpold, H., Wolf, D., Gastl, G., Reimer, D., Jenewein, N., Marth, C., Zeimet, A.G., 2007. Role of forkhead box protein 3 expression in invasive breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 25, 4499–4500; author reply 4500–4501.
  97. Zhang, C., Zhang, X., Chen, X.-H., 2012. Hypothesis: human umbilical cord blood-derived stromal cells regulate the Foxp3 expression of regulatory T cells through the TGF- $\beta$ 1/Smad3 pathway. *Cell Biochem. Biophys.* 62, 463–466.
  98. Zhang, H.-Y., Sun, H., 2010. Up-regulation of Foxp3 inhibits cell proliferation, migration and invasion in epithelial ovarian cancer. *Cancer Lett.* 287, 91–97.
  99. Zhang, Q., Yang, X., Pins, M., Javonovic, B., Kuzel, T., Kim, S.-J., Parijs, L.V., Greenberg, N.M., Liu, V., Guo, Y., Lee, C., 2005. Adoptive transfer of tumor-reactive transforming growth factor-beta-insensitive CD8<sup>+</sup> T cells: eradication of autologous mouse prostate cancer. *Cancer Res.* 65, 1761–1769.
  100. Zheng, Y., Josefowicz, S.Z., Kas, A., Chu, T.-T., Gavin, M.A., Rudensky, A.Y., 2007. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 445, 936–940.
  101. Zorn, E., Hercend, T., 1999. A MAGE-6-encoded peptide is recognized by expanded lymphocytes infiltrating a spontaneously regressing



human primary melanoma lesion. *Eur. J. Immunol.* 29, 602–607.

102. Zuo, T., Wang, L., Morrison, C., Chang, X., Zhang, H., Li, W., Liu, Y., Wang, Y., Liu, X., Chan, M.W.Y., Liu, J.-Q., Love, R., Liu, C.-G., Godfrey, V., Shen, R., Huang, T.H.-M., Yang, T., Park, B.K., Wang, C.-Y., Zheng, P., Liu, Y., 2007. FOXP3 is an X-linked breast cancer suppressor gene and an important repressor of the HER-2/ErbB2 oncogene. *Cell* 129, 1275–1286.



## RESUMEN BIOGRAFICO

Diana Fabiola Miranda Hernández

Candidato para el Grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Microbiología

**Tesis:** Expresión de Foxp3 en células de melanoma murino como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune tumoral.

**Campo de estudio:** Ciencias de la Salud.

**Datos personales:** Nacida en Torreón, Coahuila el 17 de abril de 1985, hija de Juan Carlos Miranda Sifuentes y Maria Guadalupe Hernández Rangel.

**Educación:** Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2006. Con mención honorífica por trayectoria académica y defensa de tesis.

Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Maestría en Ciencias con especialidad en Inmunobiología en 2008. Con mención honorífica por trayectoria académica y defensa de tesis.

### **Artículos publicados:**

Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Miranda-Hernández D, Zapata-Benavides P, Castillo-León L, Isaza-Brando C, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. In vitro effects of bovine dialyzable leukocyte extract (bDLE) in cancer cells. *Cytotherapy*. 2006;8(4):408-14.

Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Zapata-Benavides P, Castillo-Tello P, Isaza-Brando CE, Zamora-Avila D, Rivera-Morales LG, Miranda- Hernández DF, Sierra-Rivera CA, Vera-García ME, Tamez-Guerra RS, Rodríguez- Padilla C.



Antiangiogenic and antitumor effects of IMMUNEPOTENT CRP in murine melanoma. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2010 Mar 5.

Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Sierra-Rivera CA, Gómez-Flores RA, Zapata-Benavides P, Castillo-Tello P, Alcocer-González JM, Miranda-Hernández DF, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. Antitumor activity of colloidal silver on MCF-7 human breast cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2010 Nov 16;29:148.

M.C. Diana Fabiola Miranda-Hernández, Dr. Moisés A. Franco-Molina, Dra. Lydia Guadalupe Rivera-Morales, Dra. Cristina Rodríguez-Padilla Alimentación: su impacto sobre el sistema inmune y cáncer. *Respyn* 2011.

Moisés A. Franco-Molina\*, Edgar Mendoza-Gamboa, Diana F. Miranda-Hernández, Crystel A. Sierra-Rivera, Pablo Zapata-Benavides, Magda E. Vera-García, Reyes S. Tamez-Guerra and Cristina Rodríguez-Padilla. Anti-inflammatory and antioxidant effects of IMMUNEPOTENT CRP in Lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human macrophages. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 5(22), pp. 3726-3736, 16 October, 2011.

Miranda-Hernández DF<sup>1§\*</sup>, Franco-Molina MA<sup>1\*</sup>, Mendoza-Gamboa E<sup>1</sup>, Zapata-Benavides P<sup>1</sup>, Sierra-Rivera CA<sup>1</sup>, Coronado-Cerda EE<sup>1</sup>, Rosas-Taraco AG<sup>2</sup>, Taméz-Guerra RS<sup>1</sup> and Rodríguez-Padilla C<sup>1</sup>. Expression of Foxp3, CD25, and IL-2 in the B16F10 cancer cell line and melanoma is correlated with tumor growth in mice. *Oncol Lett.* 2013 Nov;6(5):1195-1200. Epub 2013 Aug 13.